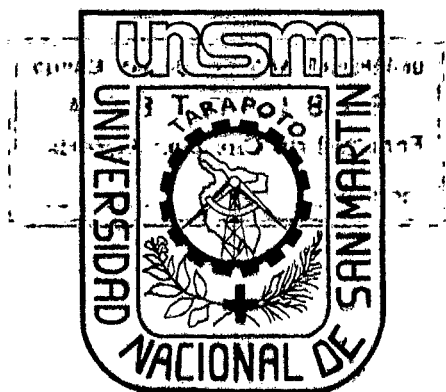


UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN - TARAPOTO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE AGROSILVO PASTORIL
ESCUELA ACADÉMICO - PROFESIONAL DE AGRONOMÍA



TESIS

**“CONTROL BIOLÓGICO DE *Verticillium dahliae*
PATÓGENO DE CACAO (*Theobroma cacao*), CON
AISLAMIENTOS DE *Trichoderma* spp ENDÓFITO”**

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

INGENIERO AGRÓNOMO

PRESENTADO POR EL BACHILLER:

JACK FLAVIO VIENA BARDALES

TARAPOTO - PERÚ

2015

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN – TARAPOTO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE AGROSILVO PASTORIL
ESCUELA ACADÉMICO-PROFESIONAL DE AGRONOMÍA



TESIS

“CONTROL BIOLÓGICO DE *Verticillium dahliae*
PATÓGENO DE CACAO (*Theobroma cacao*)
CON AISLAMIENTOS DE *Trichoderma* spp ENDÓFITO”

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:
INGENIERO AGRÓNOMO

PRESENTADO POR EL BACHILLER:
JACK FLAVIO VIENA BARDALES

TARAPOTO – PERÚ
2015

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN-TARAPOTO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE AGROSILVO PASTORIL
ESCUELA ACADÉMICO-PROFESIONAL DE AGRONOMÍA
ÁREA DE MEJORAMIENTO Y PROTECCIÓN DE CULTIVOS**

TESIS

**“CONTROL BIOLÓGICO DE *Verticillium dahliae*
PATÓGENO DE CACAO (*Theobroma cacao*)
CON AISLAMIENTOS DE *Trichoderma* spp ENDÓFITO”**

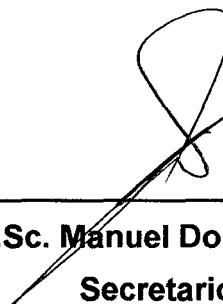
**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:
INGENIERO AGRÓNOMO**

**PRESENTADO POR EL BACHILLER:
JACK FLAVIO VIENA BARDALES**

COMITÉ DE TESIS



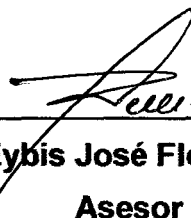
**Ing. M.Sc. Dr. Orlando Ríos Ramírez
Presidente**



**Ing. M.Sc. Manuel Doria Bolaños
Secretario**



**Ing. M.Sc. Patricia E. García Gonzáles
Miembro**



**Ing. Eybis José Flores García
Asesor**

DEDICATORIA:

A mis abuelitos

Isabel y Darío a quienes les debo todo en esta vida, a ti abuelita que eres como una madre para mí, por haberme apoyado en todo momento, pero más que nada, por tu amor y cariño, con tu hermoso ejemplo de honestidad y fortaleza, alientas siempre mi corazón. A ti abuelito Darío que desde el cielo estás iluminando y velando por mi, en cada paso que doy brindándome fortaleza y firmeza para seguir adelante. Este logro es para ti.

A ti Mamá Madeley

Por haberme educado y soportar mis errores. Gracias por tus consejos, por el apoyo en todo momento, por la motivación constante, por el amor que siempre me has brindado, por cultivar e inculcar en mí valores que me ha permitido ser una persona de bien. ¡Gracias por darme la vida, te quiero mucho!

A ti Papá Vidmer.

A quien le agradezco el cariño, la comprensión, la paciencia y el apoyo que me brindaste para culminar mi carrera profesional y todo el apoyo incondicional, este es un logro que quiero compartir contigo, gracias por creer en mi.

A mi familia.

A mis tíos Lidoro, Ricardo, Carmelo, Rubén y, a ti tía Dolly, que eres como una mamá para mí, gracias por sus apoyo incondicional y constante, siempre están deseándome lo mejor. A mis primos Katty, Cristhian y Richard quienes de lejos están siempre a mi lado con su amor y humildad que llenan mi vida de felicidad, gracias a toda mi familia por brindarme la dicha.

AGRADECIMIENTO:

Al Instituto de Cultivos Tropicales (ICT), por brindarme sus instalaciones y todas las facilidades posibles para poder lograr satisfactoriamente el trabajo de investigación y comprometerse siempre con la agricultura, generando desarrollo en la amazonia peruana, con la investigación científica, extensión y desarrollo de mercado, aplicando nuevas tecnologías para el mejoramiento de la agricultura.

Un agradecimiento muy especial a mis Co-asesores, a la **Ing. M.Sc. Betsabe Leon Ttacca** y al **Dr. Ph. Enrique Arévalo Gardini**, por el asesoramiento recibido y por su apoyo incondicional, brindándome las facilidades del laboratorio, y sobre todo, por su tiempo y conocimiento para poder realizar el presente trabajo de investigación; además agradecer infinitamente a toda la familia del ICT, en especial a mis amigos Kadir Márquez, Jaime Cayotopa, Delmar Olivera, Mar Gárate, Juan Arévalo, Angel Tuesta, Paquita Lao, Rolando Ramírez, Boris Gutarra y Meyer Obando por su amistad, gran espíritu y calidad humana.

A un gran amigo y hermano **Erick Trigozo Bartra**, quien con su constante apoyo, me ayuda a darme cuenta de mis errores y a ser una mejor persona cada día.

A mis amigos, compañeros tesisistas; Ginsberg, Marcelino, Juan Luis, Edin Vílchez, Jorge Arévalo, Gina Paola, y Juan Cueva, gracias por el apoyo en el proceso de desarrollo de la tesis.

A mis queridos compañeros, amigos de universidad y a la Tuna Universitaria, quienes fueron testigos paso a paso de todo este proceso vividos durante 5 años,

que hoy se ve reflejado en manuscrito, no podría despedirme sin agradecerles a ustedes Patricia Paredes del Águila, Alejandro Aguirre Ramírez, Henry Ali Sánchez Santa Cruz, Rocio Lluliana Mercado Aguilar, Samy Carolina Torres Panduro, Celma Antonia Ríos Antúncar, Juan Carlos Amasifuen Flores, Rosa Mili Sandoval, Ana María Bocanegra, Gian Franco Angulo Ríos, Amilton Yrigoin Perez, Ivan Isuiza Cachique, José Antonio Flores Torres, Dino Díaz Perez.

De todo corazón mis más sinceros agradecimientos a todas y cada una de las personas que me brindaron su colaboración, sus conocimientos, su apoyo desinteresado en el trascurso de la investigación, y por sobre todo gracias por su gran amistad brindada. Y pedir mil disculpas a todas aquellas personas que no he mencionado, pero que me han enseñado una lección de vida durante estos años, a todas ustedes también. Muchas gracias.

CONTENIDO

	Pág.
I. INTRODUCCIÓN.	1
II. OBJETIVOS.	3
III. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.	4
3.1 Generalidades sobre el cacao.	4
3.1.1 Origen y distribución.	4
3.1.2 Importancia socio-económica del cacao.	4
3.1.3 Biología y botánica del cacao.	5
3.1.4 Descripción de la planta.	6
3.1.5 Taxonomía.	7
3.1.6 Propagación.	7
3.1.7 Requerimientos ambientales.	7
3.2 Enfermedades del cacao.	8
3.3 Muerte Súbita en cacao.	9
3.3.1 Morfología del patógeno.	10
3.3.2 Taxonomía.	11
3.3.3 Signos.	11
3.3.4 Síntomas.	12
3.3.5 Ciclo de la enfermedad.	13
3.3.6 Medidas de control.	14
3.4 Control biológico.	15
3.4.1 Hongos endófitos.	16
3.4.2 Estudios realizados de hongos endófitos en el cultivo de cacao.	16
3.5 Aspectos generales de <i>Trichoderma</i> .	18
3.5.1 Clasificación taxonómica.	18
3.5.2 <i>Trichoderma</i> spp. en el control biológico.	19
3.6 Mecanismos de acción de <i>Trichoderma</i> .	19
3.6.1 Por competencia.	20
3.6.2 Por micoparasitismo.	21
3.6.3 Antibiosis.	23
3.6.3.1 Por producción de enzimas hidrolíticas.	25
3.6.3.2 Por metabolitos secundarios.	27
a. Metabolitos de bajo peso molecular y volátiles.	27
b. Metabolitos de alto peso molecular y polares.	28
3.6.4 Promoción de crecimiento en plantas.	28
3.6.5 Inductor de resistencia en plantas.	29
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.	31
4.1 Ubicación del lugar experimental.	31
4.2 Origen de los aislamientos de <i>Trichoderma</i> .	32
4.3 Preparación de medios de cultivo.	33
4.4 Reactivación e incremento de inóculo de <i>Trichoderma</i> .	34
4.5 Origen del aislamiento de <i>Verticillium dahliae</i> .	35
4.6 Incremento de inóculo de <i>Verticillium dahliae</i> .	35
4.7 Esterilización de suelo.	36

4.8	Capacidad antagónica <i>in vitro</i> de aislamientos de <i>Trichoderma</i> endófito hacia <i>Verticillium dahliae</i> .	37
4.8.1	Antibiosis.	37
4.8.2	Prueba de micoparasitismo.	39
4.9	Efecto de aislamientos de <i>Trichoderma</i> endófito en el control de <i>Verticillium dahliae</i> a nivel de invernadero.	40
4.9.1	Producción de inóculo de <i>Trichoderma</i> y <i>Verticillium dahliae</i> .	40
4.9.2	Tratamientos.	40
4.9.3	Colecta de semillas.	41
4.9.4	Pre-germinación de semillas de cacao en medio Agar Agua.	41
4.9.5	Inoculación de <i>Trichoderma</i> spp., endófito en semillas pre-germinadas.	42
4.9.6	Siembra de semillas pre-germinadas colonizas con <i>Trichoderma</i> en suelo estéril.	43
4.10	Inoculación de <i>Verticillium dahliae</i>	44
4.11	Variables de evaluación	46
4.11.1	Inhibición del crecimiento micelial de <i>Verticillium dahliae</i>	46
4.11.2	Porcentaje de inhibición micelial de <i>Verticillium dahliae</i> por <i>Trichoderma</i> endófito	46
4.11.3	Índice de severidad de la enfermedad	47
4.11.4	Incidencia de la enfermedad	49
4.11.5	Peso seco de la biomasa	49
4.11.6	Longitud de Raíz	49
4.11.7	Altura de Planta	49
4.12	Diseño experimental	50
V.	RESULTADOS	51
5.1	Prueba de biocontrol <i>In vitro</i>	51
5.1.1	Prueba de antibiosis	51
5.1.2	Prueba de micoparasitismo	54
5.2	Prueba de biocontrol en invernadero	57
5.2.1	Incidencia	57
5.2.2	Severidad	61
5.2.3	Longitud de Raíz	65
5.2.4	Altura de planta	67
5.2.5	Biomasa seca de plantas de cacao	69
VI.	DISCUSIÓN	71
6.1	Capacidad antagónica <i>in vitro</i> de aislamientos de <i>Trichoderma</i> endófito sobre <i>Verticillium dahliae</i> .	71
6.2	Efecto de aislamientos de <i>Trichoderma</i> endófito en el control de <i>Verticillium dahliae</i> L., patógeno de <i>Thebroma cacao</i> a nivel de invernadero.	76
VII.	CONCLUSIONES	87
VIII.	RECOMENDACIONES	89
IX.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90
	RESUMEN	
	SUMMARY	
	ANEXOS	

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Procedencia de los aislamientos de <i>Trichoderma</i> endófitos de <i>Theobroma cacao</i> , utilizados para el control de <i>V. dahliae</i> .	33
2	Lista de los tratamientos evaluados en la prueba de biocontrol en invernadero.	41
3	Análisis de Varianza del porcentaje de inhibición micelial de <i>Verticillium dahliae</i> en presencia de metabolitos secundarios de aislamientos de <i>Trichoderma</i> endófito.	51
4	Porcentaje de Inhibición del crecimiento micelial de <i>Verticillium dahliae</i> en medio PSA conteniendo metabolitos secundarios de aislamientos de <i>Trichoderma</i> endófito.	52
5	Análisis de varianza del porcentaje de colonización de aislamientos <i>Trichoderma</i> endófito hacia <i>Verticillium dahliae</i> .	54
6	Porcentaje de colonización de aislamientos de <i>Trichoderma</i> hacia <i>Verticillium dahliae</i> .	55
7	Análisis de varianza del porcentaje de incidencia de la muerte súbita causada por <i>Verticillium dahliae</i> en plantas de cacao de tres meses de edad colonizadas con aislamientos de <i>Trichoderma</i> endófito.	57
8	Incidencia (%) de la muerte súbita causada por <i>Verticillium dahliae</i> en plantas de cacao colonizadas con aislamientos de <i>Trichoderma</i> endófito.	58
9	Análisis de varianza del porcentaje de severidad de la muerte súbita causada por <i>Verticillium dahliae</i> en plantas de cacao de tres meses de edad colonizadas con aislamientos de <i>Trichoderma</i> endófito.	61
10	Severidad de la muerte súbita causada por <i>Verticillium dahliae</i> en plantas de cacao colonizadas con aislamientos de <i>Trichoderma</i> endófito.	62
11	Análisis de varianza de longitud de raíz determinadas en plantas de cacao de tres meses de edad, colonizadas con aislamientos de <i>Trichoderma</i> endófito, 18 DDI del patógeno.	65
12	Longitud de raíz (cm) de plantas de cacao de tres meses de edad colonizadas con aislamientos de <i>Trichoderma</i> endófito, 18 DDI de <i>Verticillium dahliae</i> .	65

- 13** Análisis de Varianza de altura de planta en cacao de tres meses de edad, colonizadas con aislamientos de *Trichoderma* endófito, 18 DDI del patógeno. **67**
- 14** Altura de planta (cm) en cacao de tres meses de edad colonizados con aislamientos de *Trichoderma* endófito, 18 DDI de *Verticillium dahliae*. **67**
- 15** Análisis de varianza del peso seco aéreo y raíz de plantas de cacao de tres meses de edad, colonizadas con aislamientos de *Trichoderma* endófito, 18 DDI del patógeno. **69**
- 16** Biomasa seca de plantas de cacao de tres meses de edad, colonizadas con aislamientos *Trichoderma* endófitos, después de 18 DDI de *Verticillium dahliae*. **69**

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Masas de conidios de <i>Verticillium</i> que nacen de fiálides, producidos en espiral alrededor de cada conidióforo.	10
2	Microesclerocios de <i>Verticillium dahliae</i> en un tejido infectado.	11
3	Ciclo de la enfermedad muerte súbita causada por <i>Verticillium dahliae</i> .	14
4	Laboratorio de Fitopatología - Estación Experimental "Juan Bernito" - ICT.	31
5	Mapa de ubicación de las localidades de donde fueron colectados los aislamientos de <i>Trichoderma</i> endófito.	32
6	Reactivación e incremento de inóculo de aislamientos de <i>Trichoderma</i> endófito.	35
7	Reactivación e incremento de inóculo de <i>Verticillium dahliae</i> .	36
8	Prueba de antibiosis.	38
9	Prueba de micoparasitismo.	39
10	Pre-Germinación de semillas de cacao Clon ICS-1 en medio Agar Agua.	42
11	Inoculación <i>Trichoderma</i> endófito en semillas pre-germinadas de cacao.	43
12	Metodología de siembra de semillas de ICS-1 inoculadas con aislamientos de <i>Trichoderma</i> endófito.	44
13	Inoculación de <i>Verticillium dahliae</i> en plantas de cacao de tres meses de edad.	45
14	Escala de evaluación del grado de severidad de la muerte súbita causada por <i>Verticillium dahliae</i> propuesta por Sidhu & Wedster (1977); evaluadas en hojas de cacao de tres meses, durante los 18 días después de la inoculación del patógeno.	48
15	Efecto de los metabolitos secundarios de aislamientos de <i>Trichoderma</i> endófito en la inhibición micelial de <i>Verticillium dahliae</i> .	53
16	Efectos de aislamientos de <i>Trichoderma</i> endófito en el porcentaje de colonización de <i>Verticillium dahliae</i> .	56
17	Relación comparativa del porcentaje de incidencia y AUDPC de la muerte súbita, en plantas de cacao de tres meses de edad, colonizadas con aislamientos de <i>Trichoderma</i> endófito, 18 DDI del patógeno.	59

18	Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad (AUDPC) del porcentaje de incidencia de la muerte súbita, desde 7 DDI (aparición de los síntomas) hasta los 18 DDI (Final del experimento) de <i>Verticillium dahliae</i> , en plantas de cacao de tres meses de edad, colonizadas con ocho aislamientos de <i>Trichoderma</i> endófito y un tratamiento Control.	60
19	Relación comparativa del porcentaje de severidad de la muerte súbita y AUDPC, en plantas de cacao, colonizadas con aislamientos de <i>Trichoderma</i> endófito y un Control	63
20	Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad (AUDPC) del porcentaje de severidad de la Muerte súbita causada por <i>Verticillium dahliae</i> , hasta los 18 días después de la inoculación (DDI) del patógeno, en plantas de cacao de tres meses de edad, colonizadas con ocho aislamientos de <i>Trichoderma</i> endófito y un tratamiento Control. Evaluaciones registradas a los 12, 14, 16 y 18 DDI.	64
21	Valores promedios de la altura en planta (cm) de cacao de tres meses edad colonizadas con aislamientos de <i>Trichoderma</i> endófito, a los 18 DDI de <i>Verticillium dahliae</i> .	66
22	Longitud de raíz en centímetros de plantas de cacao de tres meses de edad colonizadas con aislamientos de <i>Trichoderma</i> endófitos, 18 DDI de <i>Verticillium dahliae</i> .	68
23	Biomasa seca de la parte aérea y raíz de plantas de cacao de tres meses de edad, colonizadas con aislamientos de <i>Trichoderma</i> endófito, a los 18 DDI de <i>Verticillium dahliae</i> .	70

I. INTRODUCCIÓN

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es un cultivo de gran importancia económica en diversos países del mundo, como Costa de Marfil, Ghana, Camerún, Indonesia, Colombia, Venezuela, Perú, Ecuador entre otros. Siendo Costa de Marfil el principal productor mundial con 1 320 000 toneladas, en América el mayor productor es Brasil con 163 000 toneladas (ICCO 2005). En el Perú desde el 2001 la producción de cacao ha ido evolucionando, logrando así un crecimiento del 37 %, existen 60 320 hectáreas cultivadas y el 80% se concentra en las regiones de Cusco, San Martín, Ayacucho, y Junín, con una producción promedio de 555 Kg/ha (APPCACAO, 2009).

La producción cacaotera mundial se ha visto seriamente afectada por enfermedades fungosas. En América las más importantes son la Moniliasis (*Moniliophthora roreri*), la Escoba de bruja (*Moniliophthora perniciosa*) y la Pudrición parda (*Phytophthora palmivora*). (Bowers *et al.*, 2001; Bailey *et al.*, 2008). La muerte repentina o muerte súbita causada por *Verticillium dahliae* es otra enfermedad importante en cacao, es agente causal de la marchitez vascular de muchas hortalizas, ornamentales y cultivos de campo (Tsrer *et al.*, 2001). La disminución del rendimiento causada por *Verticillium dahliae* son frecuentes en las zonas productoras de cacao en todo el mundo (Almeida *et al.*, 1993). En general, la muerte súbita es una enfermedad difícil de controlar, debido a muchos factores como la capacidad del patógeno de sobrevivir prolongadamente en el suelo en forma de microesclerios, la amplia gama de plantas susceptibles a este y la ineficacia de los tratamientos químicos para combatir al hongo, debido a la inaccesibilidad por su ubicación en el xilema. Algunos tratamientos químicos al suelo con mezcla de Bromuro de metilo y Cloropicrina

(Actualmente fuera del mercado), han resultado eficaces aunque presentan limitaciones por su costo, dificultad de aplicación, toxicidad y perjuicio medioambiental (Tjamos y Jiménez, 1998).

Desde la perspectiva moderna para una agricultura sostenible, una de las medidas de control es el biológico, como una alternativa de solución al uso excesivo de pesticidas y reducir la contaminación ambiental. Entre dichas estrategias de control está el uso de antagonistas con potencial de ser agentes de control biológico (Berg *et al.*, 1994; Fravel *et al.*, 1986). Entre ellos se encuentran organismos endófitos, que han recibido una creciente atención por su capacidad simbiótica con diferentes plantas (Salgado *et al.*, 2005). El cacao presenta una compleja comunidad microbiana de endófitos que prometen ser candidatos para el biocontrol de enfermedades del cacao (Bailey, 2008). Y uno de estos organismos endófitos es el hongo *Trichoderma* sp; es un eficiente controlador biológico que está siendo usado ampliamente en la agricultura como agente de biocontrol debido a su capacidad de colonizar sustratos rápidamente, inducir resistencia sistémica adquirida en plantas, promover el crecimiento vegetal y poseer actividad antagonista contra un amplio rango de hongos patógenos (Tovar, 2008).

El control de *Verticillium dahliae* en el cultivo de cacao *Theobroma cacao* con aislamientos de *Trichoderma* spp endófito, contribuirá al desarrollo de la investigación y a optar por un manejo sostenible, bajo un ecosistema no contaminado y equilibrado.

II. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general:

- Determinar el efecto de aislamientos de *Trichoderma* endófito en el control de *Verticillium dahliae* L., patógeno de *Theobroma cacao*.

3.2. Objetivos específicos:

- Determinar la capacidad antagónica *in vitro* de aislamientos de *Trichoderma* endófito sobre *Verticillium dahliae*.
- Determinar el efecto de aislamientos de *Trichoderma* endófito en el control de *Verticillium dahliae* L., patógeno de *Theobroma cacao* a nivel de invernadero.

III. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3.1 Generalidades sobre el cacao

3.1.1 Origen y Distribución

Estudios más recientes confirman que la región alta del Amazonas, una zona que comprende territorios de Perú, Colombia y Ecuador es el lugar donde se encuentra la mayor diversidad genética del cacao, por lo tanto se considera su centro de origen (Lanuad *et al.*, 2000).

La dispersión por diversos lugares ha sido originada por influencia del hombre y animales, generando cruzamientos o híbridos espontáneos; así como posibles mutaciones que han creado numerosos fenotipos de cacao comercial, que hoy se cultivan (CNCH, 1988).

Esta especie se encuentra actualmente distribuida a lo largo de las regiones lluviosas de los trópicos, desde los 20° de latitud norte hasta los 20° de latitud sur, es decir desde México, hasta el sur de la Amazonia en Brasil y Bolivia (ICCO, 2003).

3.1.2 Importancia Socio-Económica del Cacao

El cacao es un cultivo fundamental dentro de la producción, de la región de San Martín y constituye, por los niveles de calidad que alcanzó, un producto de mucha importancia en la economía regional, apostando por la competitividad y sostenibilidad de la cadena productiva de este grano y sus derivados. Con más de 30 mil hectáreas de cacao que involucra más de 9 mil

productores dedicados a este cultivo, que cuentan en promedio entre dos y cuatro hectáreas, lo que no los convierte en grandes productores, pero sí en ofertantes de un alimento de calidad; convierte al cacao como el producto más importante de exportación para nuestra región. San Martín es la región con mayor exportación de grano de cacao del Perú, de donde proviene cerca del 23 % del total exportado, lo que representa un monto de 80 millones de dólares (Herrera, 2011).

3.1.3 Biología y Botánica del Cacao

El cacao *Theobroma cacao* es una planta tropical perteneciente a la familia Malvaceae, es una especie halogama, diploide ($n=20$) y de ciclo vegetativo perenne (Cope, 1976).

El árbol del cacao, es de crecimiento vertical y continuo, su brotación es discontinua, así como su floración. Puede alcanzar alturas de hasta 20 m cuando tiene condiciones óptimas de crecimiento, la raíz principal es pivotante, con hojas simples, enteras y de colores variables que van desde morado hasta verde pálido, con pecíolo corto (Hardy, 1961). Las flores son pequeñas, hermafroditas y pentámeras con cinco lóculos donde hay de 6 a 12 óvulos, las flores al igual que los frutos se producen en racimos pequeños, sobre el tejido maduro del tronco y de las ramas (Mejía y Arguello, 2000). La polinización natural es esencialmente entomófila, principalmente llevada a cabo por individuos del género *Forcipomya*. (Cope, 1976). Los frutos maduran entre 5 y 6 meses después de la polinización, posee un mesocarpio de

contextura lisa o arrugada que se divide en cinco carpelos interiormente, el fruto es de tamaño y forma muy variable, tienen diversos colores al madurar (rojo, amarillo, morado y café); contienen entre 20 y 40 semillas, estas semillas son cotiledonares cubierta de una pulpa mucilaginosa de color blanco, los cotiledones pueden ser de blanco a violeta (Mejía y Arguello, 2000).

3.1.4 Descripción de la Planta

El cacao es un árbol que presenta un marcado dimorfismo de ramas. En una planta que proviene de semilla hay un solo eje vertical, que al alcanza de 1 a 1,5 m de altura detiene el crecimiento apical y emite en la parte superior de 3 a 5 ramas laterales. Estas brotan de yemas tan juntas que parecieran que salieran del mismo plano y forman una horqueta, cuando en realidad son nudos distintos, cuyo nivel de separación es muy corta. Para continuar el crecimiento vertical brota de bajo de la horqueta una yema, rara vez dos o tres, que se desarrollan en otro tallo ortotrópico a cuyo extremo se detiene de nuevo el crecimiento apical; se forma así otro piso y continua así el proceso (León, 2000).

3.1.5 Taxonomía

La clasificación taxonómica es la siguiente: (Motamayor, 2001).

Reino	: Plantae
Subreino	: Tracheobionta
División	: Ansgiospermas
Clase	: Dicotiledóneas
Subclase	: Dilleniidae
Orden	: Malvales
Familia	: Sterculiaceae
Subfamilia	: Byttnerioideae
Género	: <i>Theobroma</i>
Especie	: <i>cacao</i>

3.1.6 Propagación

El cultivo de cacao se puede propagar en forma sexual (por semilla botánica) y en forma asexual (estacas, acodos e injertos).

Cuando el cultivo se va a propagar por semilla, es necesario conocer el biotipo y las principales características de las plantas productoras de semillas para que reciban un adecuado tratamiento con la finalidad que estas puedan crecer bien conformadas, uniformes y con alta producción (MINAG, 2004).

3.1.7 Requerimientos Ambientales

Es una planta que prospera bien bajo sombra; sin embargo necesita condiciones especiales de luminosidad, temperatura y provisión de agua (Arévalo *et al.*, 2004). Los factores climáticos más importantes para el desarrollo del cacao son la temperatura y la lluvia, y le siguen en importancia

el viento, la luz, la radiación solar y la humedad relativa (Enríquez, 1987). El cacao se desarrolla bajo temperaturas medias anuales de 21 °C (Sánchez y Dubón, 1994); la temperatura es un factor de mucha importancia debido a su relación con el desarrollo, floración y fructificación del cultivo de cacao, también controla la actividad de las raíces y de los brotes de la planta. (PROAMAZONIA, 2004). Los rangos óptimos de agua oscilan entre 1500 y 2500 mm en las zonas bajas cálidas y entre 1200 y 1500 mm en las zonas frescas o los valles altos (Sánchez y Dubón, 1994). Requiere suelos ricos en materia orgánica, profundos, franco arcillosos, con buen drenaje, topografía regular y con pH que oscilan entre 4 y 7 (FUNDACITE, 1998).

3.2 Enfermedades del Cacao

La pudrición parda (causado por *Phytophthora* spp.), moniliasis (*Moniliophthora roreri*) y escoba de bruja (*Moniliophthora perniciosa*), son los principales patógenos del cacao, capaces de causar pérdidas completas de rendimiento, con una reducción anual en la producción de cacao estimada en más de 700 000 toneladas de almendras, correspondiendo a mas de 700 millones de dólares US (Bowers *et al.*, 2001; Bailey *et al.*, 2008). En la amazonia, la escoba de bruja puede causar entre 50 a 90% de pérdidas en mazorcas y cerca de 30% de la producción mundial de cacao se pierde gracias a la mancha parda (Johnston, 1997).

Existen otras enfermedades en el cultivo que causan pérdidas indirectas como es el “Mal de Machete” causado por *Ceratocystis fimbriata*, “Las Bubas”

causado por *Calonectria rigidiscula* (Brandeau, 1970) y "Pie Negro" (*Rosellinia* spp) (Hernández *et al.*, 1990); cuyos daños y síntomas se pueden observar en hojas y flores. La muerte repentina o muerte súbita es otra enfermedad de cacao que podría ser de importancia económica debido a su difícil control, causado por el hongo *Verticillium dahliae*, puede convertirse en una de las enfermedades de mayor importancia en las zonas cacaoteras (Delgado, 1991).

3.3 Muerte Súbita en Cacao

También conocida como muerte repentina o verticilosis, cuyo agente causal es *Verticillium dahliae* (Kleb.), patógeno de la marchitez vascular de muchas hortalizas, plantas ornamentales y cultivos de campo (Tsrer *et al.*, 2001).

La presencia de esta enfermedad es frecuente en las zonas productoras de cacao de todo el mundo; la aparición de los síntomas como el estrés hídrico, necrosis, epinastia y la caída de las hojas, provocan pérdidas que disminuyen el rendimiento del cultivo (Almeida *et al.*, 1993). La enfermedad se encuentra distribuida en una diversidad de suelos y climas, desde el nivel del mar hasta los 4 000 m.s.n.m.m. La incidencia en algunos casos llega hasta un 60% y en otros hasta un 70%. Además, la enfermedad ocasiona pérdidas en los rendimientos entre 25 y 46% (Torres y Gutierrez, 1981).

Verticillium dahliae produce estructuras resistentes llamados microesclerocios, estos sobreviven durante muchos años. Así, el control a

menudo es costoso, con un complejo manejo integrado, incluyendo las prácticas de esterilización, el uso de productos químicos y cultivares resistentes (Fradin y Thomma, 2006).

3.3.1 Morfología del Patógeno

Verticillium pertenece a las clases de hongo, Deuteromycetes (Hongos Imperfectos), un grupo de hongos que no tienen una fase sexual conocido. El micelio vegetativo es hialinos, septados, y multinucleadas. Los núcleos son haploides. Las conidias son ovoides o elipsoides y por lo general con una sola célula. Ellos nacen en fiálides, que son las hifas especializadas producido en una espiral alrededor de cada conidióforo. Cada fialide lleva una masa de conidias. Las fiálides se posicionan en el conidióforo en "verticiladas", por ello el nombre de *Verticillium* (Berlanger y Powelson, 2000).

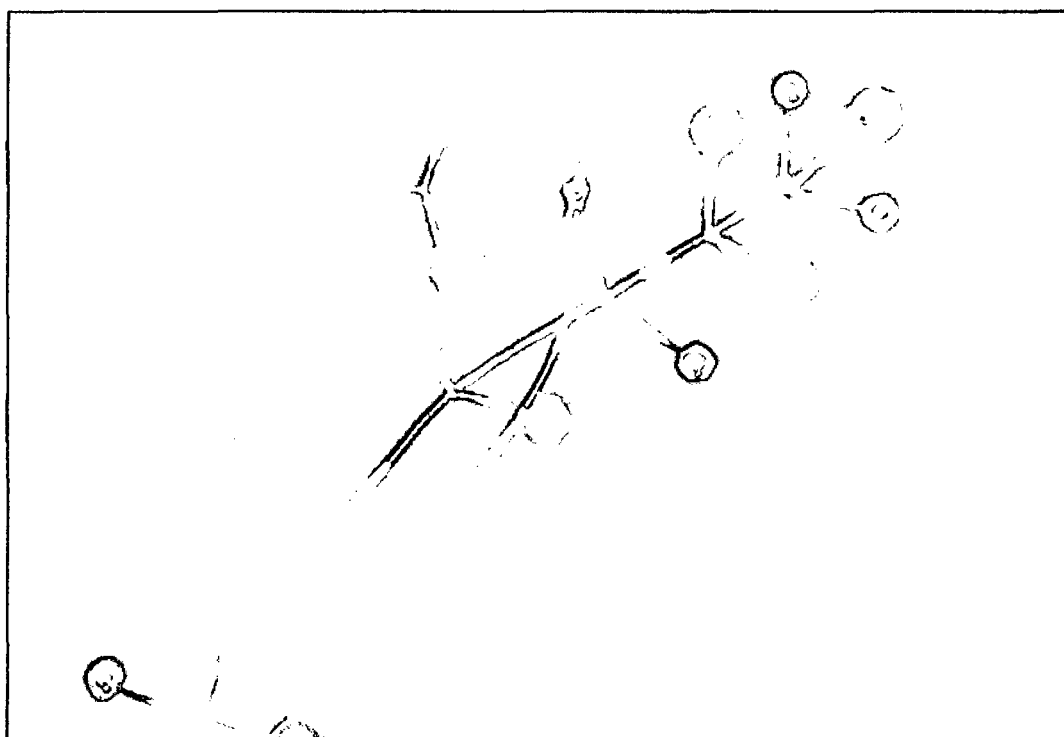


Figura 1. Masas de conidias de *Verticillium* que nacen de fiálides, producidos en espiral alrededor de cada conidióforo.

3.3.2 Taxonomía

Ubicación taxonómica de *Verticillium dahliae* (Kleb.), es la siguiente (Blanco et al., 1984).

Phylum: Deuteromycota

Clase: Deuteromycetes

Orden: Hypocreales

Familia: Monilaceae

Género: *Verticillium*

Especie: *dahliae*

3.3.3 Signos

Son pequeñas estructuras de reposo o de resistencia, de color negras, con paredes gruesas, llamadas también microesclerocios, se forman en el tejido muerto o en el tejido vivo y con frecuencia son visibles con una lupa de mano. En la mayoría de los hospedantes los microesclerocios se forman en los tejidos senescentes, pero son evidentes también en tejido vivo de algunas de plantas (Berlanger y Powelson, 2000).

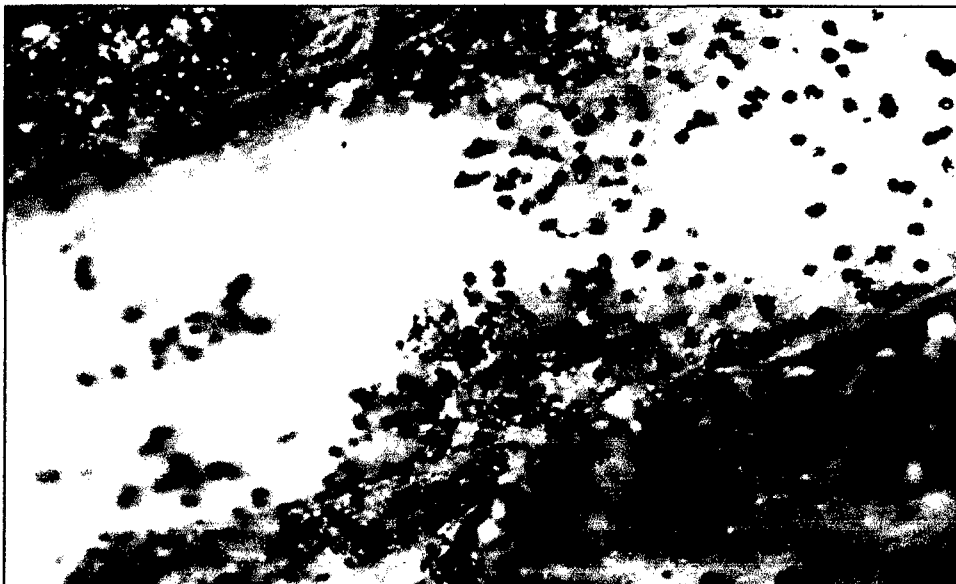


Figura 2. Microesclerocios de *Verticillium dahliae* en un tejido infectada

3.3.4 Síntomas

Los síntomas varían un poco entre los hospedantes, sin embargo, la prematura clorosis foliar y necrosis, por la obstrucción vascular de los tallos y raíces, son características de todos los hospedantes (Berlanger y Powelson, 2000).

En las especies leñosas perennes inicialmente se observa un amarillamiento en las hojas más jóvenes, luego una necrosis en los brotes que invade toda la hoja y adquiere una coloración marrón intensa, las hojas necrosadas se vuelven frágiles y caen, dando una apariencia de muerte descendente, se puede observar una quemazón de los brotes tiernos y necrosis de ramas en toda la planta; así mismo, se hace evidente una flacidez y amarillamiento de las ramas afectadas, hasta que sobreviene la muerte de las mismas; posteriormente, la corteza se vuelve fibrosa y se separa con facilidad de la madera (Rumbos, 2005).

Los síntomas pueden aparecer afectando algunas ramas de la planta y no a otras, o en caso de árboles jóvenes, provocando la muerte completa del árbol. El desarrollo de los síntomas puede ser en determinados casos muy severo. Los síntomas de la Verticilosis suele manifestarse con más severidad en plantaciones jóvenes (de 3-4 años), aunque este hecho depende marcadamente de la cantidad de hongo en el suelo, de su virulencia (aislados defoliantes altamente virulentos o no defoliantes moderadamente virulentos)

de la susceptibilidad del cultivar plantado y del manejo de la plantación (Blanco y Jiménez, 1995).

3.3.5 Ciclo de la Enfermedad

Verticillium dahliae, es un hongo del suelo que produce estructuras multicelulares microscópicas denominadas microesclerocios, el hongo se puede encontrar en el suelo en forma de micelio y conidios o en forma de microesclerocios; también puede tener un desarrollo saprofítico de escasa importancia, la principal forma de supervivencia del hongo en el suelo es como microesclerocios (Blanco y Jiménez, 1995).

Los exudados radiculares del cacao u otros huéspedes y también de plantas inmunes a la infección, como algunas monocotiledóneas, estimulan la germinación de los microesclerocios, las hifas ingresan a través de las heridas causadas por insectos, nematodos o prácticas culturales. El hongo avanza inter e intracelularmente a través de la epidermis alcanzando el xilema, sin causar daños aparentes en el sistema radicular; en el xilema se produce crecimiento micelial y formación de conidios que son transportados con la savia ascendente y forman nuevas colonias del hongo, avanzando este a lo largo del tallo y peciolo. Cuando los síntomas son severos se forman nuevos microesclerocios, primero en el xilema y después en el resto de los tejidos. Al defoliarse las plantas enfermas y descomponerse las hojas caídas en el suelo quedan libres los microesclerocios para reiniciar ciclos de infección (Jiménez y Montes, 1974).

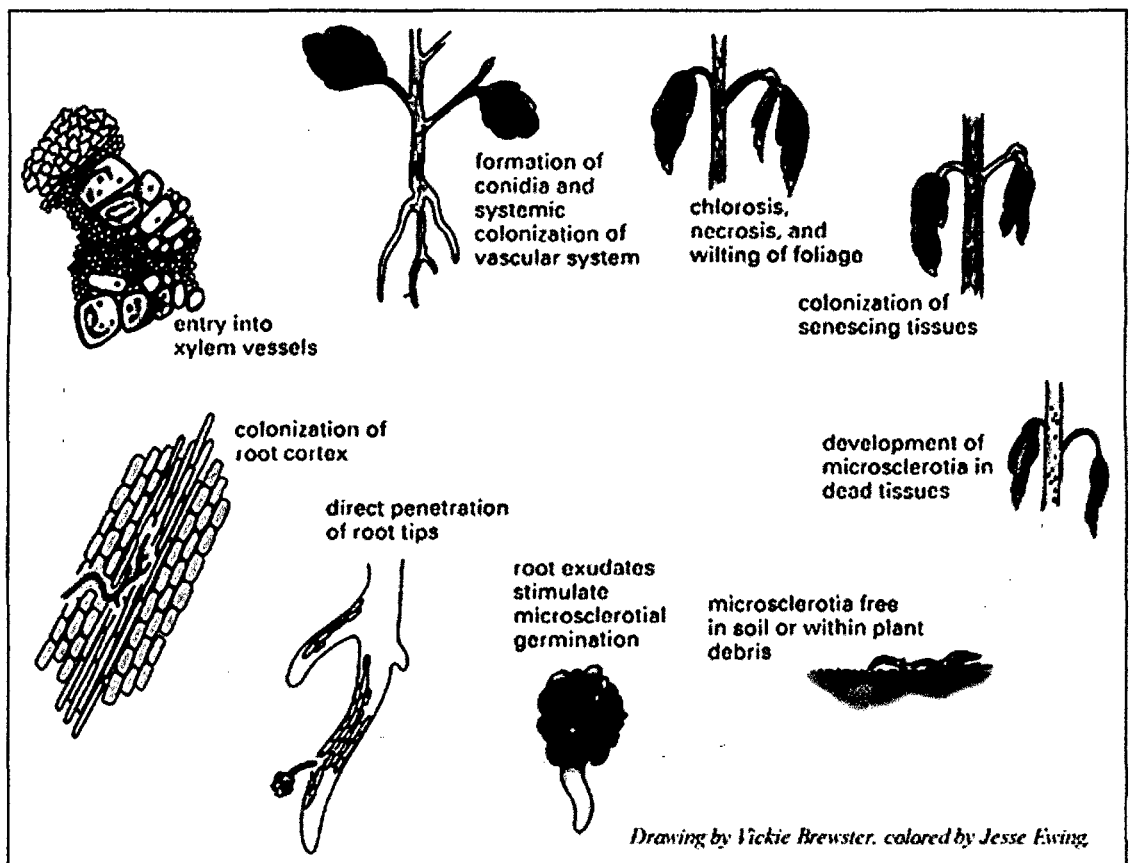


Figura 3. Ciclo de la enfermedad muerte súbita causada por *Verticillium dahliae*

3.3.6 Medidas de Control

El control de la muerte súbita o la marchitez causada por *Verticillium dahliae*, no es fácil debido a las características específicas del patógeno y su ciclo de patogénesis; es una enfermedad difícil de combatir debiéndose aplicar una estrategia de lucha integrada, básicamente preventiva (Blanco y Jiménez, 1995).

Actualmente la medida más eficaz es la prevención, porque la transmisión del hongo es mediante los restos de poda y hojas de árboles infectados, por arrastre de tierra, por el agua de riego. Las condiciones que lo hacen

extremadamente difícil de controlar son la elevada supervivencia de los esclerocios y su ubicación en el árbol (xilema), difícil de tratar químicamente. El uso de los químicos, muestra también desventajas debido a sus altos costos y a los efectos que pueda ocasionar en el ambiente. Las estrategias de control biológicas, son una nueva alternativa; pero que requieren un poco más de investigación. La resistencia genética, que tiene como finalidad la renovación del material genético, incorporando características deseables como: la tolerancia a enfermedad, rendimiento, calidad y producción (Wessel y Gerritsma, 1994).

3.4 Control Biológico

El control biológico (CB), se define como cualquier condición o practica por medio de la cual la sobrevivencia o actividad de un patógeno se reduce a través de la mediación de cualquier otro organismo, excepto el hombre, con disminución de la incidencia de la enfermedad (Garrett, 1965). Entre los antagonistas estudiados con patógenos del suelo, de enfermedades como secadera, pudrición de raíz y de la corona, así como marchitez vascular, muerte súbita o verticilosis, con sus respectivos agentes causales, se ha evaluado con éxito a: *Trichoderma*, *Gliocladium*, *Penicillium*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Pythium*, *Laetisaria*, *Sporidesmium*, *Coniothyrium*, y *Talaromyces* (Nelson, 1991).

3.4.1 Hongos Endófitos

Los hongos endófitos son organismos que viven en asociación con plantas en mayor parte o en todo su ciclo de vida, y se encuentran en las hojas y los tallos de muchas plantas, con relación simbiótica, que no producen síntomas de enfermedad en la planta, aunque algunas veces pueden presentar un grado de patogenicidad leve, estando relacionados taxonómicamente con los hongos fitopatógenos (Carroll, 1988). Viven en los espacios intercelulares y, algunas veces, intracelularmente en hojas, tallos y flores, absorbiendo nutrientes de la planta; en algunos casos, confieren beneficios a la planta que pueden resultar mutuos: utilizan los nutrientes que sintetiza la planta y ésta se beneficia de los metabolitos bioactivos que ellos producen (Bacon y Hinton, 1997).

3.4.2 Estudios Realizados de Hongos Endófitos en el Cultivo de Cacao

Estos son hongos filamentosos inherentes a las plantas que les sirven de hospedero con las cuales establecen una asociación específica que genera mutuos beneficios. Existen un sin número de especies vegetales de importancia económica que interactúan con especies de hongos caracterizados como endófitos, entre ellas se pueden resaltar la interacción del cacao (*Theobroma cacao*) con los hongos *Heisteria concinna* y *Ouratea lucens* (Arnold *et al.*, 2003); recientemente se aislaron la misma planta más de 800 hongos endófitos con alto potencial biocontrolador (Crozier *et al.*, 2006). Otro ejemplo es el hongo *Guignardia citricarpa* encontrado en varias especies de cítricos (Glienke-Blanco *et al.*, 2002).

En la Isla de Barro Colorado en Panamá, se estudió la colonización por endófitos de acuerdo al hábitat y a la edad de las hojas de *Theobroma cacao* (Malvaceae), resultando sin diferencia significativa la incidencia de endófitos de acuerdo al hábitat, pero con mayor frecuencia de estos en hojas maduras (Arnold y Herre, 2003). Así mismo, se logró aislar una alta diversidad de endófitos como *Colletotrichum* sp, *Fusarium* sp y *Xylaria* sp, a partir de tejidos de hojas (Arnold *et al.*, 2003).

El estudio más impactante en especies tropicales es el de Arnold *et al.*, (2003), donde se detectó un antagonismo entre hongos endófitos naturales y agentes patógenos del cacao.

Existen reportes, donde indican que, aislamientos de hongos endófitos de *Trichoderma* spp, fueron aislados de frutos y corteza de plantas de especies de *Theobroma*, 15 cepas de *Trichoderma*, representado por siete especies potenciales, fueron seleccionados para la caracterización de la influencia de la inoculación de *Trichoderma* endófito en el crecimiento y establecimiento del hongo en plantas de cacao; así mismo, estudios realizados *in vitro*, indican que los aislamientos de *Trichoderma* evaluados en la producción metabolitos inhibitorios para *M. royeri* mostraron diferencias, así como también su habilidad para parasitar cultivos de *M. royeri* (Bailey, 2008).

3.5 Aspectos Generales de *Trichoderma*

Las especies de *Trichoderma* se encuentran presentes en todas las latitudes, desde las zonas polares hasta la ecuatorial. Esta distribución tan amplia y su plasticidad ecológica están estrechamente relacionadas con la alta capacidad enzimática que poseen para degradar sustratos, un metabolismo versátil y resistencia a inhibidores microbianos. Este género es un excelente modelo para ser estudiado debido a su fácil aislamiento y cultivo, rápido desarrollo en varios sustratos y por su condición de controlador biológico de una amplia gama de fitopatógenos (Fernández, 2001).

3.5.1 Clasificación Taxonómica

La clasificación taxonómica del género *Trichoderma* es la siguiente (Papavizas, 1985).

Súper Reino	: Eucariota
Reino	: Fungi
Filum	: Ascomycota
Subfilum	: Pezizomycotina
Clase	: Sordariomycetes
Subclase	: Hypocreomycetidae
Orden	: Hypocreales
Familia	: Hypocreaceae
Género	: <i>Trichoderma</i>

3.5.2 *Trichoderma* spp en el Control Biológico

T. harzianum y *T. virens* son especie más reportadas en control biológico de fitopatógenos del suelo, son efectivas contra *R. solani*, *Colletotrichum* spp., *S. sclerotiorum*, *Sclerotium rolfsii*, *F. oxysporum*, *Phytophthora parasitica*, *P. ultimum*, *Verticillium* spp. y *Thelaviopsis* spp, entre otros (Nelson, 1991; Samuels, 1996). El hongo *Trichoderma* se utilizó con éxito contra hongos que causan enfermedades en tomate, tabaco, chile; además es compatible con biofertilizantes, bioestimulantes y plaguicidas (Stefanova, 1997). En viveros comerciales se aplica a plántulas de pepino y chile incorporándolo al sustrato y reduce los problemas por estrés hídrico un 67% al trasplante y mejora la calidad de la planta (Inbar *et al.*, 1994). Así mismo se reportó que aislamientos del género *Trichoderma* son considerados como agente potencial de control biológico de *M. perniciosa*; (Michel-Aceves *et al.*, 2001; Samuels, 2004). Además, el género *Trichoderma* ha sido estudiado por muchos investigadores por su eficacia en el biocontrol de hongos patógenos de plantas (Beagle y Papavizas, 1985). Existen reportes donde indican que *T. harzianum*, *T. virens*, y *T. theobromicola*, tienen la mayor capacidad biocontroladora in vitro sobre *M. perniciosa* (Rivas y Pavone, 2010).

3.6 Mecanismos de Acción de *Trichoderma*

En la acción biocontroladora de *Trichoderma* se han descrito diferentes mecanismos de acción que regulan el desarrollo de los hongos fitopatógenos. Entre estos, los principales son la competencia por espacio y nutrientes, el micoparasitismo y la antibiosis, los que tienen una acción directa frente al

hongo fitopatógeno, (Lorenzo, 2001). Otro mecanismos de acción, reportado es la inducción de resistencia en plantas, ya que estimula lo mecanismos naturales de defensa de las plantas como la de mejorar la producción de hormonas, peroxidasas y compuestos fenólicos, entre otros (Stefanova y Sandoval, 1995).

3.6.1 Por Competencia

La competencia constituye un mecanismo de antagonismo muy importante. Este tipo de antagonismo se ve favorecido por las características del biocontrolador como velocidad de crecimiento y desarrollo, y por otro lado por factores externos como tipo de suelo, pH, temperatura, humedad, entre otros (Ahmad y Baker, 1987).

La presencia de forma natural de *Trichoderma* en diferentes suelos, se considera una evidencia de la habilidad como excelente competidor por espacio y recursos nutricionales, aunque la competencia depende de la especie (Samuels, 1996). De tal forma que la causa más común de la muerte de un microorganismo es por inanición (Garet, 1965), muchos microorganismos requieren de nutrientes exógenos para germinar, penetrar e infectar el tejido del hospedero (Baker y Griffin, 1995). Principalmente de carbono, nitrógeno y hierro (Inbar y Chet, 1997). La alta velocidad de crecimiento, abundante esporulación y la amplia gama de sustratos sobre los que puede crecer, debido a la riqueza de enzimas que posee, hacen que sea muy eficiente como saprófito y aún más como agente de control biológico

(Hjeljord *et al.*, 1998; Pérez, 2004). En este sentido, Silvan *et al.*, (1987) encontraron que *T. harzianum* (T-35) controlaba a *Fusarium* spp; en vario cultivos, pudiendo operar vía competencia de nutrientes en la colonización de la rizosfera, así como por Carbono, Nitrógeno y Espacio.

3.6.2 Por Micoparasitismo

El micoparasitismo se define como la relación que un organismo establece con un hongo huésped de manera que se beneficia del mismo, normalmente obteniendo nutrientes, sin aportarle nada a cambio y, en ocasiones, causando su muerte. Cuando ocurre esto último se habla de micoparasitismo necrotrófico, para diferenciarlo del biotrófico, en el que se mantiene una relación con células vivas durante largos periodos de tiempo (Melgarejo y Sagasta, 1989; Lorito, 1990; Díaz, 1994; Ulloa, 1996).

En resumen el micoparasitismo implica principalmente, el reconocimiento del hospedante, la secreción de enzimas en la lisis de la pared celular, la secreción de metabolitos secundarios, la formación de las estructuras de penetración, y la lisis del hongo huésped (Bruce *et al.*, 1995).

Los eventos que conllevan al micoparasitismo son complejos y tienen lugar de una manera secuencial. En primer lugar, *Trichoderma* localiza al patógeno y comienza a crecer por tropismo hacia él (Lu *et al.*, 2004; Woo *et al.*, 2006). Esta detección a distancia se debe, al menos parcialmente, a un gradiente químico generado por una secreción secuencial de enzimas que degradan la

pared celular de los hongos (EDPCH). Aunque las diferentes cepas de *Trichoderma* pueden seguir distintos patrones de inducción de EDPCH parece seguro que una exoquitinasa extracelular, producida de forma constitutiva a bajos niveles, podría estar implicada en este proceso. Esta exoquitinasa provoca la liberación de algunos oligómeros de la pared del hongo atacado, induciendo la expresión de endoquitinasas del micoparásito (*Trichoderma*) (Brunner *et al.*, 2003; Harman, 2006), que al ser liberadas, difunden y hacen que *Trichoderma* comience el ataque al hongo, antes de que se haya producido el contacto físico (Viterbo *et al.*, 2002; Deng *et al.*, 2007; Distefano *et al.*, 2008). Una vez que los hongos entran en contacto, *Trichoderma* puede enrollarse alrededor de su presa y formar estructuras especializadas de tipo apresorio, con las que podrá penetrar posteriormente en el interior de las hifas del patógeno. La unión parece estar determinada por la interacción entre carbohidratos (generalmente galactosa o fructuosa) de la pared celular de *Trichoderma* y lectinas del hongo parasitado (Inbar y Chet, 1996; Rocha-Ramírez *et al.*, 2002; Reithner *et al.*, 2005; Zeilinger *et al.*, 2005). Una vez en contacto, *Trichoderma* produce varias EDPCH y antibióticos, como los peptabioles (Schirmböck *et al.*, 1994; Degenkolb *et al.*, 2008), abren poros en la pared celular del hongo parasitado, finalmente *Trichoderma* entra al interior del micelio hospedador y digiere el contenido intracelular del hongo, fase que va acompañada de algunos cambios morfológicos como vacuolización, pérdida de citoplasma y desintegración de las hifas del hospedador (Benhamou y Chet, 1997). En algunos casos, también se observa la

esporulación de *Trichoderma* después de la completa digestión del hongo atacado (Elad *et al.*, 1984).

3.6.3 Antibiosis

Desde 1965, Jackson define la antibiosis como la condición por la cual uno o mas metabolitos son excretados por un organismo y tiene efecto dañino sobre otro o mas organismos; al respecto Handelsman y Parke (1989) restringen la definición mencionando que, solo son aquellas interacciones que involucran a compuestos difusibles de bajo peso molecular o un antibiótico producido por un microorganismo que inhiba el desarrollo de otro, esta definición excluyen a proteínas y enzimas que matan al organismo. Es la inhibición o destrucción de un organismo por la producción metabólica de otro, que incluye, enzimas hidrolíticas, metabolitos secundarios volátiles y pequeñas moléculas tóxicas (Baker y Griffin, 1995).

La antibiosis es el fenómeno mediante el cual un hongo antagonista inhibe o destruye a un organismo a través de la producción de pequeñas moléculas tóxicas, volátiles y de enzimas líticas (Baker y Griffin, 1995). Las cuales disuelven o dañan polímeros estructurales, como quitina y β -1-3-glucanos, de la pared celular en la mayoría de los hongos fitopatógeno, produciendo un efecto adverso sobre su desarrollo y diferenciación (Goldman *et al.*, 1994).

Entre las enzimas líticas que producen las especies de *Trichoderma*, se reportan a las quitinasas, glucanasas (Bruce *et al.*, 1995; Benhamou y Chet,

1997), proteasas y celulasas; algunas están relacionadas con el fenómeno de antibiosis y micoparasitismo al degradar la pared celular y micoparasitar al hospedante (Schickler y Chet, 1997).

Algunos autores opinan que la antibiosis no debe ser el principal mecanismo de acción de un antagonista, ya que existe el riesgo de aparición de cepas del patógeno resistentes al antibiótico (Campbell, 1989).

Muchas cepas de *Trichoderma* producen metabolitos secundarios volátiles y no volátiles, algunos de los cuales inhiben el desarrollo de otros microorganismos con los que no hacen contacto físico. Tales sustancias inhibidoras son consideradas antibióticos (Hjeljord, 1998).

La producción metabólica de los aislamientos de *Trichoderma* presenta, al igual que el micoparasitismo, determinada especificidad. Al evaluar un grupo de cepas de *Trichoderma* denominado "Q" produjeron gliotoxina y fueron efectivas frente a *R. solani*, pero no frente a *Pythium ultimum* Trow; mientras que otro grupo de cepas "P", que excretaron gliovirina mostraron resultados opuestos (Samuels, 1996).

La antibiosis en *Trichoderma* spp., puede efectuarse por producción de enzimas hidrolíticas y por metabolitos secundarios, volátiles o no (Jensen y Wolffhechel, 1995).

3.6.3.1 Por producción de enzimas hidrolíticas

Las investigaciones más recientes sobre los posibles mecanismos que intervienen en el control biológico por especies de *Trichoderma* han dado lugar a varias explicaciones alternativas para el éxito control biológico. Una idea que se ha avanzado es que las enzimas tales como quitinasas y/o glucanasas producidas por el agente biocontrolador, son responsables de la supresión del patógeno de plantas. Estas enzimas rompen los polisacáridos, como la quitina, y β -glucanos que son responsables la rigidez de las paredes celulares fúngicas, destruyendo así la integridad de la pared celular (Howell, 2003). La mayoría de los hongos patógenos contienen en su pared celular quitina y β -1-3-glucanos y disolución o daño de esos polímeros estructurales tienen efecto adverso sobre el desarrollo y diferenciación de tales hongos (Inbar y Chet, 1997). La quitina en la pared celular del hongo se presenta como una capa microfibrilar primaria o como un complejo interior de capas con glucanos y proteínas (Benhamou y Chet, 1997).

Se sabe de la capacidad de las especies de *Trichoderma* de producir enzimas hidrolíticas, entre ellas celulasas, quitinasas, glucanasas (Bruce *et al.*, 1995), proteasa y xilanasas, las cuales en presencia del patógeno incrementan su actividad. Los aislamientos de *Trichoderma* hidrolizan la quitina, lo que indican la presencia de actividad de enzimas hidrolíticas de carácter quitinolítico (Stefanova y Sandoval, 1995). Las quitinolíticas, glucanolíticas y en algunas veces proteolíticas, están implicados en los

mecanismos de biocontrol y pueden inhibir la proliferación de fitopatógenos (Noronha y Ulhoa, 1996; Samuels, 1996; Elad y Kapat, 1999).

La quitina es un polímero no ramificado de 1,4- β -enlazado con N-acetil-D-glucosamina y es el principal componente de la pared celular de la mayoría de los hongos fitopatógenos. Además de la quitina el esqueleto de la pared celular de los hongos filamentosos contiene 1,3- β -glucanos, proteínas y lípidos (Hunsley y Burnett, 1970). Las quitinasas son capaces de hidrolizar la pared celular de hongos que contienen quitina, participando de manera importante en la respuesta de la planta. Una de las estrategias para incrementar la tolerancia de las plantas hacia patógenos los constituye la sobreexpresión de proteínas involucradas en los mecanismos de defensa de las plantas (Schickler y chet, 1997).

Las β -1,3-glucanasas son enzimas que hidrolizan los enlaces glucosídicos de las cadenas de β -1,3-glucanos, las cuales, las cuales han sido caracterizadas de hongos, plantas y bacterias (Pan, Ye y Kuc, 1992). La degradación de los glucanos por hongos es frecuente acompañada por una acción sinérgica de ambas, endo y exo β -1,3-glucanasas, de hecho en la mayoría de los casos β -1,3-glucanasas, se encuentra como una sola enzima. Las enzimas β -1,3 y β -1,6-glucanasas son producidas por diferentes cepas de *Trichoderma* spp; las cuales dependen de las diferentes fuentes de carbono (Lorito *et al.*, 1994).

La cantidad de quitinasas glucanasas, xilanasas y celulasas producidas por los diferentes microorganismos antagónicos es variable y no siempre está relacionado con la actividad para controlar enfermedades (Lorito *et al.*, 1994).

3.6.3.2 Por metabolitos secundarios

Durante años los metabolitos secundarios fueron sólo materia de interés para los químicos orgánicos que se ocupaban principalmente de su aislamiento, identificación y síntesis, pero no de aspectos como el metabolismo del hongo o sus interacciones ecológicas. Los metabolitos secundarios producidos por *Trichoderma* se clasifican en diferentes grupos según su origen biosintético y su estructura química. Por lo general, una cepa tiene la capacidad de producir varios metabolitos, algo que dificulta poder relacionar una determinada ruta biosintética con su capacidad de biocontrol. De manera general, en base a las estructuras identificadas hasta ahora de los diferentes metabolitos que exhiben actividad antibiótica en *Trichoderma* (Cardoza *et al.*, 2005). Se pueden distinguir dos grupos principales:

a) Metabolitos de bajo peso molecular y volátiles:

Incluyen compuestos aromáticos sencillos, algunos poliquétidos como pironas y butenólidos, terpenos volátiles y de tipo isociano, y sustancias relativamente no polares que tienen una presión de vapor significativa. En el ambiente del suelo, estos compuestos orgánicos volátiles, podrían

recorrer distancias a través del sistema edáfico y la rizosfera, y mejorar la condición de un organismo al modificar la fisiología de otros organismos competidores, como sucede con la 6-pentil- α -pirona (6PP) (Keszler *et al.*, 2000; Vinale *et al.*, 2008; Daoubi *et al.*, 2009).

b) Metabolitos de alto peso molecular y polares:

Incluye peptabioles que pueden exhibir su actividad en interacción directa por contacto entre especies de *Trichoderma* y sus antagonistas (Sivasithamparam y Ghisalberti, 1998; Szekeres *et al.*, 2005). Entre los metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana más representativos del género *Trichoderma* están los peptabioles, los poliquétidos y los terpenos (Cardoza *et al.*, 2005; Reino *et al.*, 2008).

3.6.4 Promoción de Crecimiento en Plantas

En los últimos años se ha comprobado la capacidad de ciertas cepas de *Trichoderma* (*T. harzianum* y *T. virens*) para estimular el crecimiento y el desarrollo de las raíces de las plantas, lo que se traduce en un incremento de la productividad (Harman *et al.*, 2004). Para explicar este hecho se han sugerido varios mecanismos como son: la producción de factores de crecimiento y vitaminas, el control de patógenos menores o la conversión de material no utilizable (metales como zinc, manganeso, hierro, cobre) en formas que puedan ser asimiladas por las plantas (Altomare *et al.*, 1999).

Otras propiedades identificadas en *Trichoderma* a lo largo del proceso de interacción con la planta, son la resistencia a diferentes tipos de estrés abióticos y cambios en el estado nutricional (Howel, 2003). Estudios recientes demuestran que algunas cepas de *Trichoderma* pueden regular los niveles de auxina en la rizosfera (Contreras-Cornejo *et al.*, 2009) y estimular el crecimiento de las plantas (Chang *et al.*, 1986; Yedidia *et al.*, 2001), además de proteger el sistema radical e inducir la defensa sistémica frente al ataque de patógenos.

Sin embargo, no todas las especies de *Trichoderma* pueden estimular el crecimiento y las defensas de la planta. El grupo *Brevicompactum* engloba especies que producen metabolitos secundarios, como *harzianum* A o *trichodermina*, y se sitúan filogenéticamente alejadas de los linajes que agrupan a las especies de biocontrol. De hecho, se ha documentado que sustancias como *harzianum* A y *trichodermina* son fuertes inhibidores de la germinación de semillas y no promueven el crecimiento de las plantas por ser sustancias fitotóxicas (Cutler y LeFiles, 1978; Nielsen *et al.*, 2005; Degenkolb *et al.*, 2008).

3.6.5 Inductor de Resistencia en Plantas

La capacidad de distintas cepas de *Trichoderma* para proteger a la planta frente a patógenos de raíz se atribuyó, durante mucho tiempo, a un efecto directo contra el patógeno (Chet *et al.*, 1998). Sin embargo, se ha demostrado que la asociación directa de *Trichoderma* con las raíces de la planta, estimula

los mecanismos de defensa de la misma (Bailey *et al.*, 1993; Yedidia *et al.*, 1999; Korolev *et al.*, 2008; Segarra *et al.*, 2009), lo que conlleva a una resistencia contra varios tipos de microorganismos fitopatógenos e incluso nemátodos (Harman *et al.*, 2004). Esta resistencia inducida no es específica de un determinado tipo de planta y puede ser localizada o sistémica, capacitándola para ejercer una respuesta mayor y más rápida ante el ataque de patógenos (Conrath y col., 2002). Esta respuesta incluye la secreción de peroxidasas, la síntesis de fitoalexinas (Howell *et al.*, 2000), la expresión de genes que codifican proteínas relacionadas con la patogénesis o “PRs” (proteínas producidas por la planta como respuesta a patógenos y heridas), la biosíntesis de compuestos terpénicos (Howell *et al.*, 2000 y 2006) o el aumento de los niveles de ácido salicílico y ácido jasmónico (Shoreish *et al.*, 2005; Segarra *et al.*, 2009).

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Ubicación del lugar experimental

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Fitopatología e invernadero, de la estación experimental "Juan Bernito", del Instituto de Cultivos Tropicales (ICT), ubicado a 06° 00' 28" de latitud Sur, 76° 00' 18" latitud Oeste y 315 m.s.n.m.m. en el distrito de la Banda de Shilcayo, Provincia y Departamento de San Martín-Perú (Figura 4).

El desarrollo de la investigación se realizó en dos etapas; la primera a nivel de Laboratorio, y la segunda a nivel de invernadero.

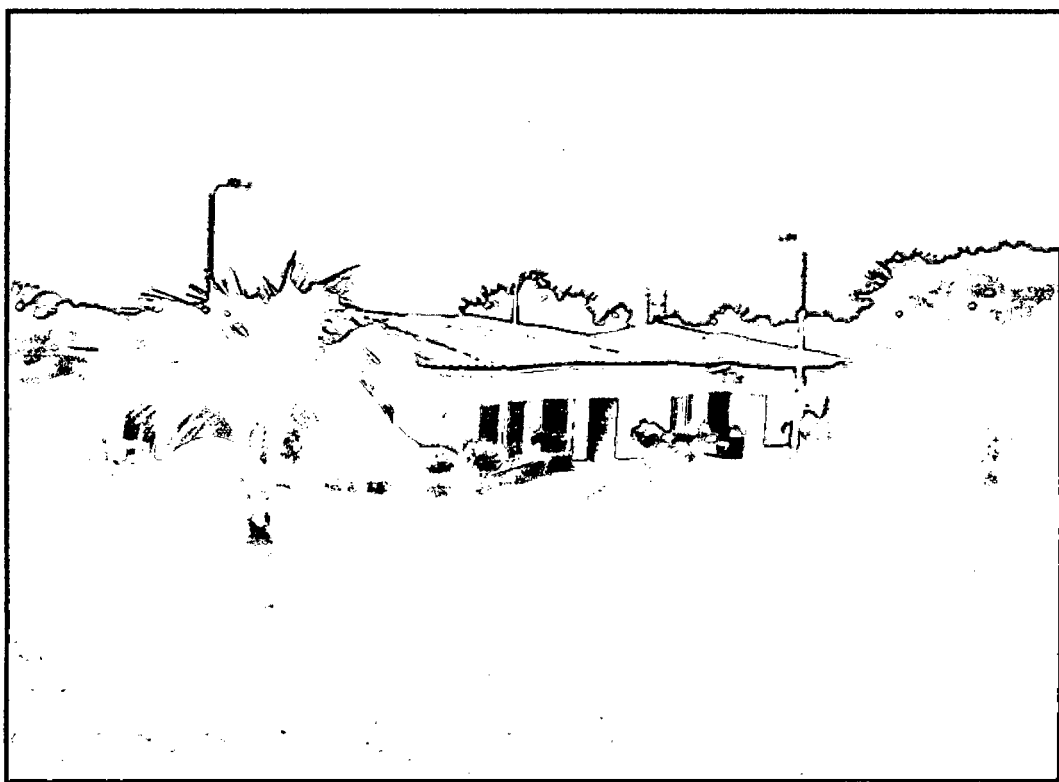


Figura 4. Laboratorio de Fitopatología - Estación Experimental "Juan Bernito" - ICT.

4.2 Origen de los aislamientos de *Trichoderma* endófito

Los aislamientos de *Trichoderma* endófito fueron colectados de hojas y tallos de plantas de cacao nativo, durante la primera expedición que realizó el ICT, por las localidades del Alto Amazonas en el 2008-2009, actualmente se encuentran conservados en la micoteca del Laboratorio de Fitopatología.

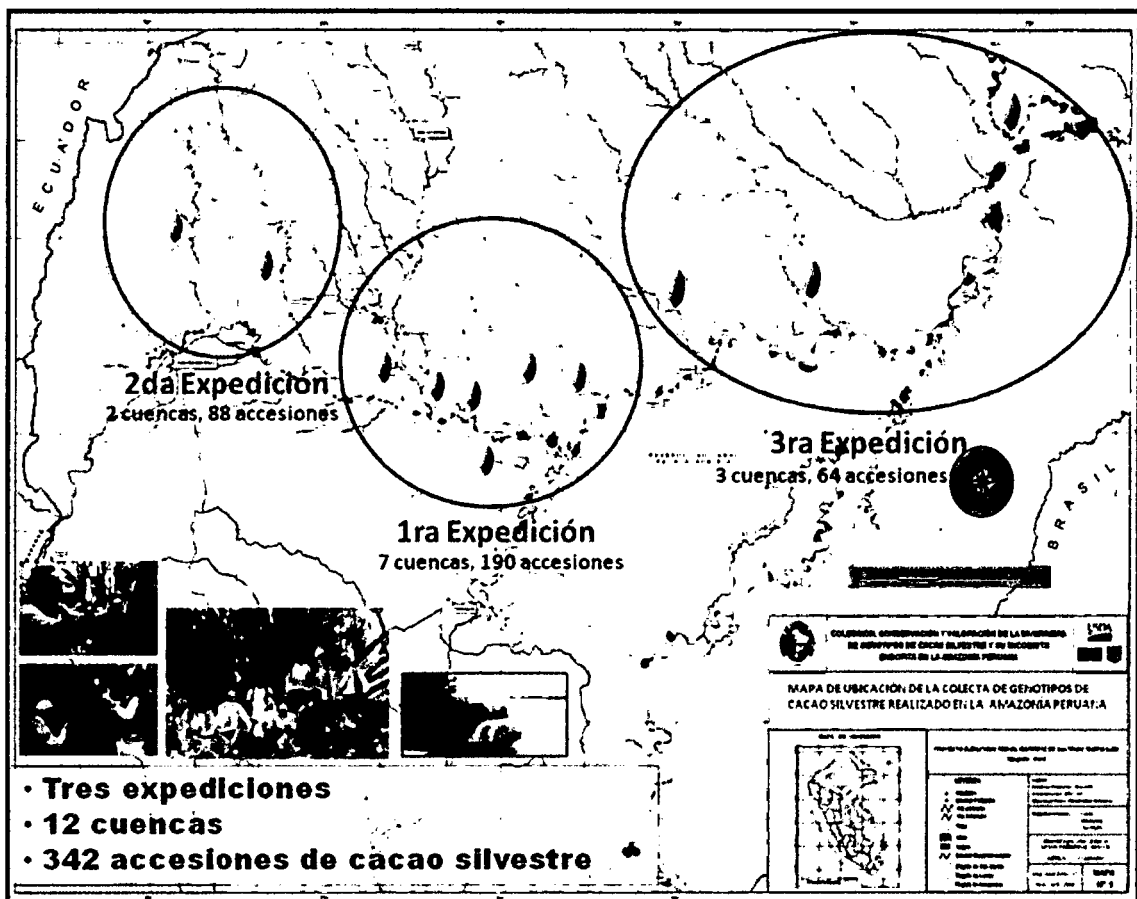


Figura 5. Mapa de ubicación de las localidades de donde fueron colectados los aislamientos de *Trichoderma* endófito.

Cuadro 1

Procedencia de los aislamientos de *Trichoderma* endófitos de *Theobroma cacao*, utilizados para el control de *V. dahliae*.

N°	Aislamiento	Órgano	Localidad
1	TE-3	Tallo	Aypena
2	TE-6	Tallo	Charupa
3	TE-7	Tallo	Charupa
4	TE-17	Tallo	Pastaza
5	TE-18	Tallo	Pastaza
6	TE-20	Tallo	Pastaza
7	TE-22	Tallo	Ungumayo
8	TE-39	Tallo	Nucuray
9	TE-50	Tallo	Urituyacu
10	TE-54	Tallo	Urituyacu
11	TE-56	Tallo	Aypena
12	TE-67	Tallo	Charupa
13	TE-72	Tallo	Ungurahui
14	TE-74	Tallo	Pastaza
15	TE-81	Tallo	Ungumayo
16	TE-83	Tallo	Ungumayo
17	TE-84	Tallo	Nucuray
18	TE-87	Tallo	Nucuray
19	TE-91	Hoja	Ungumayo
20	TE-97	Hoja	Ungumayo
21	TE-102	Hoja	Ungumayo
22	TE-105	Hoja	Urituyacu
23	TE-108	Hoja	Ungumayo
24	TE-116	Hoja	Ungumayo

4.3 Preparación de medios de cultivo

Papa sacarosa agar (PSA): En un recipiente se incorporó 250 g de papa en trozos previamente lavada, después se hizo hervir con 500 ml de agua destilada por 20 minutos aproximadamente. En otro recipiente que conteniendo 500 ml de agua destilada, se diluyó 18 g de agar con la ayuda de un horno microondas y se agregó el caldo de papa y se incorporó 10 g de

azúcar, para luego disolver, finalmente, se esterilizó a 120°C, 15 lb de presión por 20 minutos (French, 1982).

Agar agua (AA): En un recipiente conteniendo 500 ml de agua destilada incorporar 20 g de agar, diluir con ayuda de un horno microondas, enraizar con agua destilada hasta 1000 ml, para luego ser esterilizado a 120°C, 15lb de presión por 15 min (French, 1982).

4.4 Reactivación e incremento de inóculo de *Trichoderma* spp

Para el presente estudio se seleccionaron un total de 24 aislamientos de *Trichoderma* (Cuadro 1) pertenecientes a 7 localidades del Alto amazonas. Estos fueron proporcionados por el Laboratorio de Fitopatología del ICT, donde se encuentran conservados en la micoteca a -20°C, en viales con una solución de Glicerina al 20%. Para la reactivación, se extrajo de cada vial un trozo de medio de cultivo con el hongo, fueron colocados en placas petri conteniendo medio de cultivo (PSA) e incubadas a temperatura 25°C, durante 5 días. A partir de estas placas colonizadas con el hongo, se incrementó el inóculo, se extrajo un disco (0.5 cm de diámetro) de medio colonizado con el hongo y se depositó en una placa contenida medio PSA, estas fueron incubadas durante cinco días bajo luz artificial con la finalidad de inducir esporulación (Figura 6).

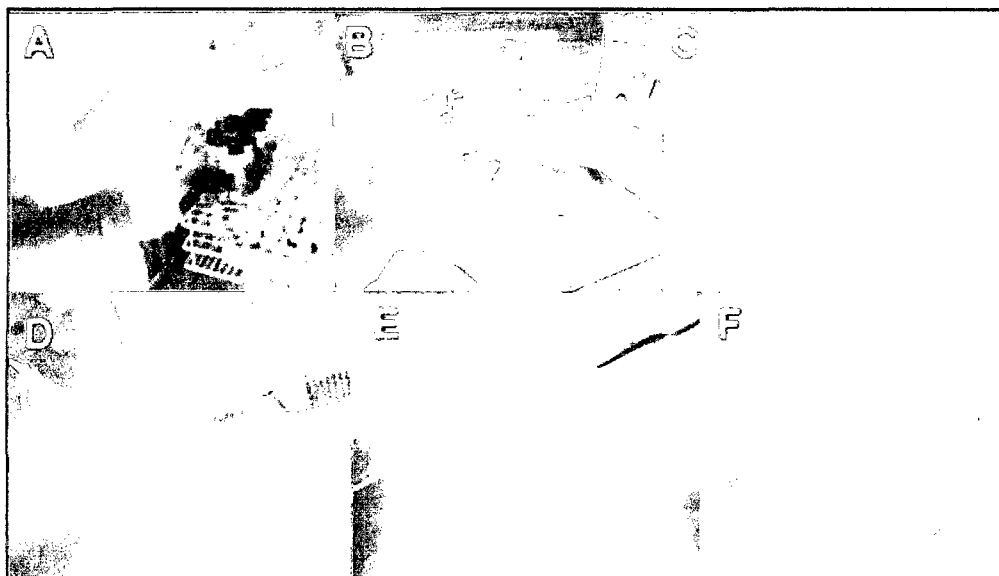


Figura 6. Reactivación e incremento de inóculo de aislamientos de *Trichoderma* endófito. A. Aislamientos de *Trichoderma* endófito conservados en viales en la micoteca a -20°C . B. Siembra de *Trichoderma* en placas Petri conteniendo PSA. C. Colonia de *Trichoderma* endófito. D-E. Repique y purificación de los aislamientos de *Trichoderma*. F. Aislamiento de *Trichoderma* purificado en medio PSA.

4.5 Origen del aislamiento de *Verticillium dahliae*

El patógeno *Verticillium dahliae* fue aislado a partir de tejidos infectados de plantas enfermas de cacao. Estas plantas fueron recolectadas por el Laboratorio de Fitopatología del Instituto de Cultivos Tropicales (ICT), de una plantación de cacao ubicada en el sector Atusparia, distrito y provincia de Tocache. Se sembró los tejidos en placas contenidas medio PSA, y se realizó las pruebas de patogenicidad. El aislamiento se conservó en una solución de glicerina a -20°C .

4.6 Incremento de inóculo de *Verticillium dahliae*

Para el incremento de inóculo del patógeno para las pruebas de antibiosis y micoparasitismo, se hizo la siembra de *Verticillium dahliae* en forma estriada en placas petri conteniendo medio de cultivo PSA; se extrajo un disco (0,5 cm de

diámetro) de medio colonizado con el patógeno y se colocó sobre el medio PSA y con la ayuda de una anza se deslizó el inóculo en forma de zig zag por toda la placa, estas fueron incubadas a $\pm 25^{\circ}\text{C}$ durante 6 días (Figura 7).

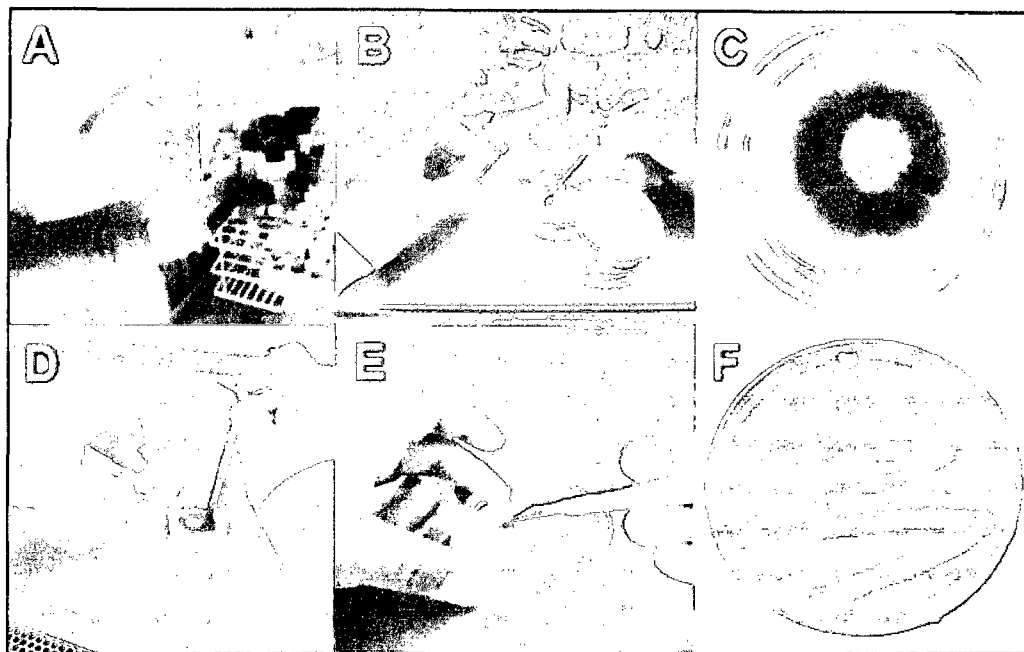


Figura 7. Reactivación e incremento de inóculo de *Verticillium dahliae*. A. Patógeno conservado en viales a -20°C . B. Siembra del patógeno en placas conteniendo PSA. C. Colonia de *Verticillium dahliae* después de 14 días de incubación a $\pm 25^{\circ}\text{C}$. D. Extracción de discos de medio PSA con colonia de *V. dahliae*. E. Siembra del patógeno en forma de estriado (zig zag) en placas Petri con PSA. F. Colonia del patógeno después de 4 días de edad.

4.7 Esterilización de suelo:

El suelo que se utilizó para la producción de plántones de cacao fue procedente del sector Tarapotillo, se realizó la caracterización físicas y químicas en el Laboratorio Químico del Instituto de Cultivos Tropicales (Anexo 15). En bolsas polipropileno de 10x15 pulgadas, se agregó 2 kg de suelo para ser esterilizado en la autoclave vertical, a 120°C de temperatura y 15 Lb de presión, por un tiempo de 60 minutos.

4.8 Capacidad antagónica *in vitro* de aislamientos de *Trichoderma* spp endófito sobre *Verticillium dahliae*.

Para determinar la capacidad antagónica *in vitro* de los 24 aislamientos de *Trichoderma* spp., sobre *Verticillium dahliae*, se realizaron pruebas de antibiosis y micoparasitismo.

4.8.1 Antibiosis

Para esta prueba se utilizó la metodología propuesta por Bailey *et al.*, (2008); que consiste en obtener metabolitos secundarios antifúngicos de *Trichoderma* en un caldo mínimo en concentración de sales (MIN). Estos fueron distribuidos en tres matraces de 100 ml, por aislamiento con 30 ml cada uno y fueron esterilizados a 120 °C de temperatura y 15 lb de presión, durante 60 minutos. Posteriormente en cada matraz se agregó asparagina (al 0,1%) y 1 ml de suspensión de conidias (1×10^6 ufc/cc) de cada aislamiento de *Trichoderma*, y al tratamiento control, sólo se agregó 1 ml de agua destilada estéril (ADE). Los matraces fueron incubados en agitación durante siete días a 110 rpm a 25 °C.

Después del crecimiento del hongo, el contenido de los matraces fueron filtrados con la ayuda de un algodón estéril, y el filtrado obtenido fue transferido a tubos de centrifuga, para ser centrifugado por 20 minutos a 2 500 rpm y eliminado el sedimento. De cada tubo sólo se extrajo 15 ml del filtrado el resto fueron conservados a -20 °C. Los 15 ml fueron colocados a baño maría a 90 °C durante dos horas, luego se agregó medio PSA con 2X

de agar con el mismo volumen del filtrado. Estos fueron distribuidos en tres placas pequeñas (60x15 mm) por tubo, donde se sembró un disco de medio con micelio del patógeno en la parte central de la placa (Figura 8), para luego ser incubadas a 25 °C hasta que el patógeno colonizó completamente las placas del control (sin metabolitos) y se realizó la medición del crecimiento micelial del patógeno.

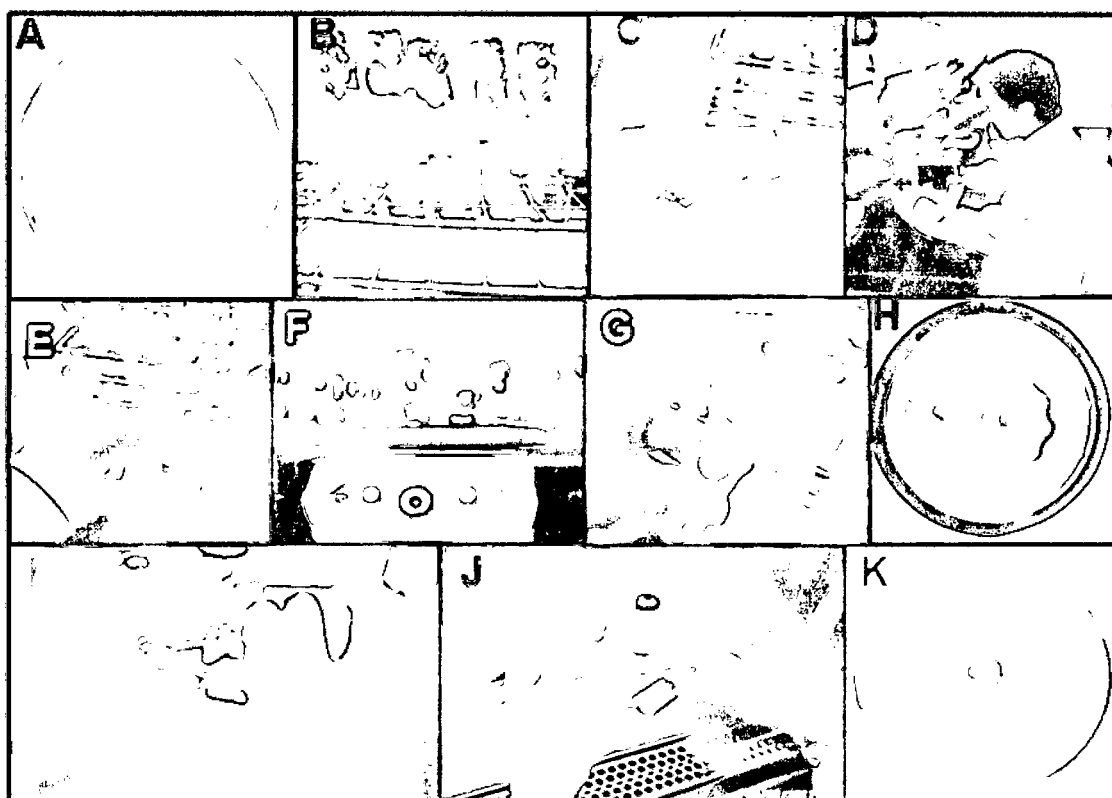


Figura 8. Prueba de antibiosis. A. Colonia de aislamiento de *Trichoderma* endófito de 5 días de edad. B. Tubos de ensayo conteniendo suspensión de conidias de *Trichoderma*. C. Dispersión de suspensión de conidias en el hematrocimetro D. Conteo de conidias en el microscopio. E. Dilución de 1 ml de suspensión de conidias (1×10^6 ufc/cc) en matraces conteniendo caldo MIN. F. Matraces en movimiento en el Shaker a 110 rpm durante 7 días. G. Cosecha de los metabolitos de *Trichoderma* en tubos de centrifuga. H. Metabolitos en centrifuga a 2500 rpm por 20 minutos, para luego llevara baño María. I. Mezcla de metabolitos con PSA 2X. J. Dilución de mezcla en placas de 60x15 mm. K. Siembra del patógeno.

4.8.2 Prueba de micoparasitismo

Se utilizó el método de placa precolonizada por el patógeno, propuesta por Baily *et al.*, (2008). A partir de los aislamientos de *Trichoderma*, se extrajo un trozo de 2,5x0,5 cm de medio colonizado con el hongo endófito de una colonia joven esporulada de 5 días, y fue localizada en un extremo de la placa precolonizada por el patógeno de 11 días y fueron incubadas en oscuridad por 14 días, por cada aislamiento se utilizó 3 repeticiones (placas precolonizadas).

Para realizar el reaislamiento del patógeno, de cada placa se extrajo diez discos de medio colonizado con los hongos y fueron sembrados en placas (90x15 mm) conteniendo medio PSA e incubadas durante cinco días, en donde se realizaron las evaluaciones de colonización de *Trichoderma* spp sobre el patógeno (Figura 9).

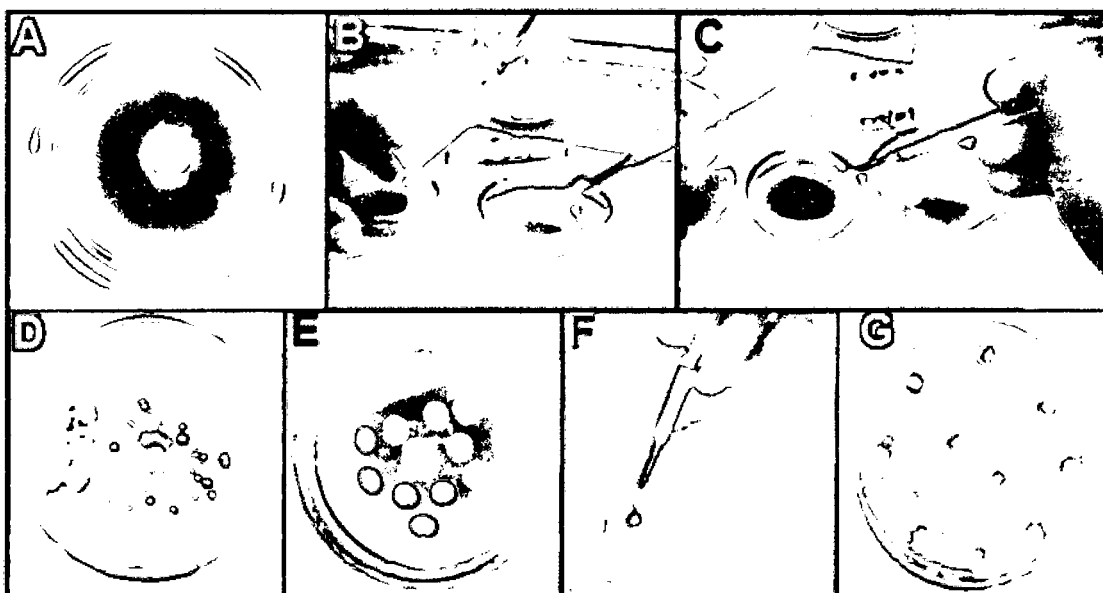


Figura 9. Prueba de micoparasitismo A. Inóculo de *Verticillium dahliae* de 11 días de edad. B. Obtención y siembra de lámina de medio PSA con colonia de *Trichoderma* endófito en placas colonizadas con *Verticillium dahliae*. D. Colonia de *V. dahliae* después de 15 días de la siembra de *Trichoderma*. E. Obtención de 10 discos de colonia del patógeno colonizado con *Trichoderma* F. Siembra de los discos en placas conteniendo medio PSA. G. Cinco días después de la incubación, evaluación del porcentaje de colonización de *Trichoderma* hacia *Verticillium dahliae*.

4.9 Efecto de aislamientos de *Trichoderma* endófito en el control de *Verticillium dahliae* L. a nivel de invernadero

Para la prueba de biocontrol en invernadero se seleccionaron ocho aislamientos al azar de *Trichoderma* endófito, de aquellos que mejor controlaron al patógeno en los ensayos *in vitro* (antibiosis y micoparasitismo).

4.9.1 Producción de inóculo de *Trichoderma* y *Verticillium dahliae*

Para la producción de inóculo de *Trichoderma* y el patógeno se siguió la misma metodología de la fase *in vitro*, utilizando placas con medio PSA. Para el incremento de inóculo de *Verticillium dahliae* se utilizó el método de siembra estriado y las placas fueron incubadas por 4 días.

4.9.2 Tratamientos

En esta fase de invernadero se estableció 10 tratamientos, con 10 repeticiones cada una (10 plantas), ocho de los tratamientos fueron plantas colonizadas por aislamientos de *Trichoderma* endófito, previamente seleccionados al azar de las pruebas *in vitro* y dos controles como tratamientos testigos, donde; el Control I fueron aquellas plantas donde no se inóculo el hongo *Trichoderma*, pero si al patógeno. Mientras que el Control II fueron plantas donde no se inóculo ninguno de los dos hongos.

Cuadro 2.

Lista de los tratamientos evaluados en las prueba de biocontrol en invernadero

Tratamiento	Aislamiento
T1	TE-3
T2	TE-7
T3	TE-54
T4	TE-84
T5	TE-87
T6	TE-91
T7	TE-97
T8	TE-108
T9	CONTROL I
T10	CONTROL II

4.9.3 Colecta de semillas

Para la producción de plantones se recolectó las mazorcas del clon ICS-1 del jardín clonal de la estación experimental Juan Bernito del ICT, se seleccionaron aquellas mazorcas con la madurez fisiológica adecuada y completamente sana. Se utilizó al clon ICS-1 como patrón debido a que está registrado como susceptible a la muerte súbita causada por *V. dahliae* (Galeas *et al.*, 2010).

4.9.4 Pre-germinación de semillas de cacao en medio agar agua

A partir de las mazorcas de cacao del clon ICS-1, se extrajo semillas de la parte central, y con ayuda de un bisturí estéril se separó el tegumento, luego las semillas fueron desinfectadas en una solución de hipoclorito al 2 % por 5 minutos y enjuagadas tres veces con agua destilada estéril (ADE). Estas

semillas se colocaron sobre papel toalla estéril para su respectivo secado, luego se sembró 120 semillas en placas grandes (95x15 mm) conteniendo medio agar agua (AA). En el centro de cada placa se colocó 4 semillas distribuidas equidistantemente, esto para que las raíces al salir no se entrecrucen y se maltraten. Finalmente estas fueron incubadas en oscuridad a 25°C durante 3 días (Figura 10).

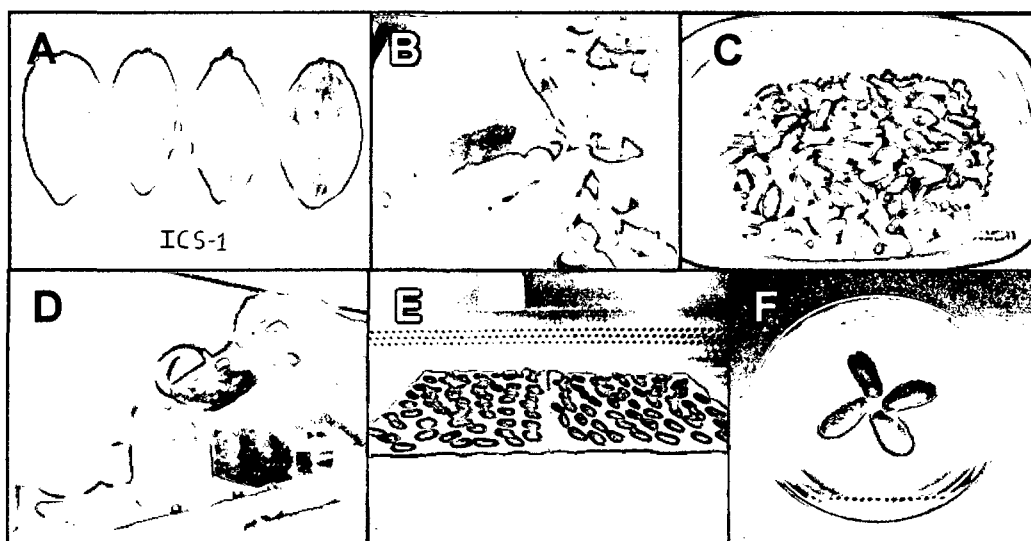


Figura 10: Pre-Germinación de semillas de cacao en medio Agar Agua. A. Frutos de cacao del Clon ICS-1. B. Descarificación de la semilla C. Semillas libres del tegumento. D. Desinfección de semillas con hipoclorito al 2 %, por 3 minutos. E. Siembra de las semillas en placas conteniendo Agar Agua (AA). F. Incubación de las semillas a 25 °C por 3 días.

4.9.5 Inoculación de *Trichoderma* spp. endófito en semillas pre-germinadas.

Para la inoculación de los aislamientos de *Trichoderma* spp en semillas pre-germinadas tres días de edad, se utilizó el método propuesto por Baily *et al.* (2008). Se extrajo tres discos (10 mm de diámetro) de medio PSA con micelio de cada aislamiento de *Trichoderma*, y se colocaron sobre la raíz de cada semilla pre-germinada, procurando cubrir el área radicular. Se inocularon a 12 semillas por cada tratamiento (aislamiento de *Trichoderma*) y dos controles

donde que no fueron inoculados con *Trichoderma*, y finalmente estas se mantuvieron en incubación a 25 °C durante 4 días en oscuridad con el propósito de que el hongo colonice la semilla (Figura 11).

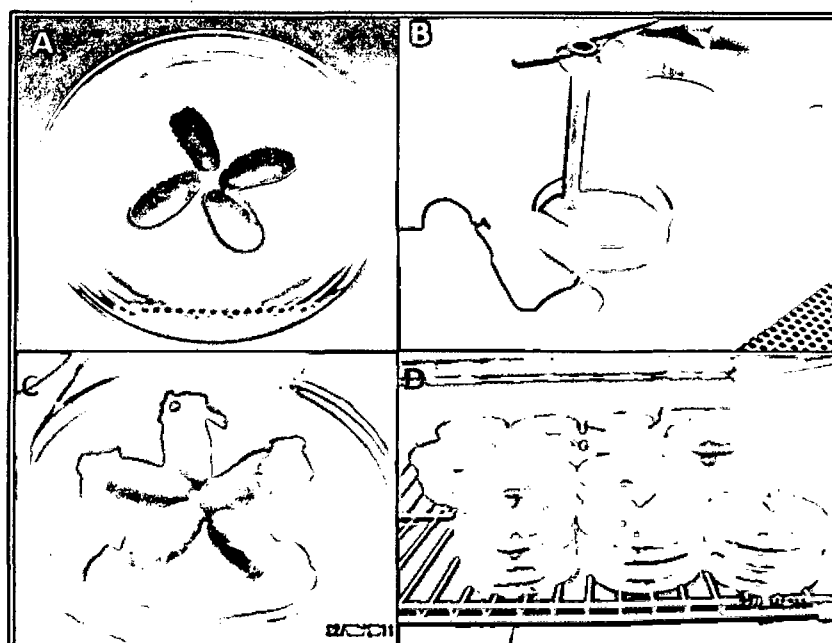


Figura 11. Inoculación *Trichoderma* endófito en semillas pre-germinadas de cacao. A. Obtención de discos de medio PSA con *Trichoderma*. B y C. Inoculación de *Trichoderma* endófitos en semillas pre-germinadas. D. Semillas inoculadas incubadas a 25 °C durante 4 días.

4.9.6 Siembra de las semillas pre-germinadas colonizadas con *Trichoderma* en suelo estéril

En bolsas de polietileno de 30x10x0.2 cm conteniendo 2 kg se suelo estéril, se sembró las semillas pre-germinadas colonizadas con aislamientos de *Trichoderma*, de las 12 semillas pre-germinadas se seleccionaron 10 por tratamiento. Los plantones de cacao se mantuvieron en el invernadero a capacidad de campo durante tres meses para luego ser inoculados con el patógeno (Figura 12).

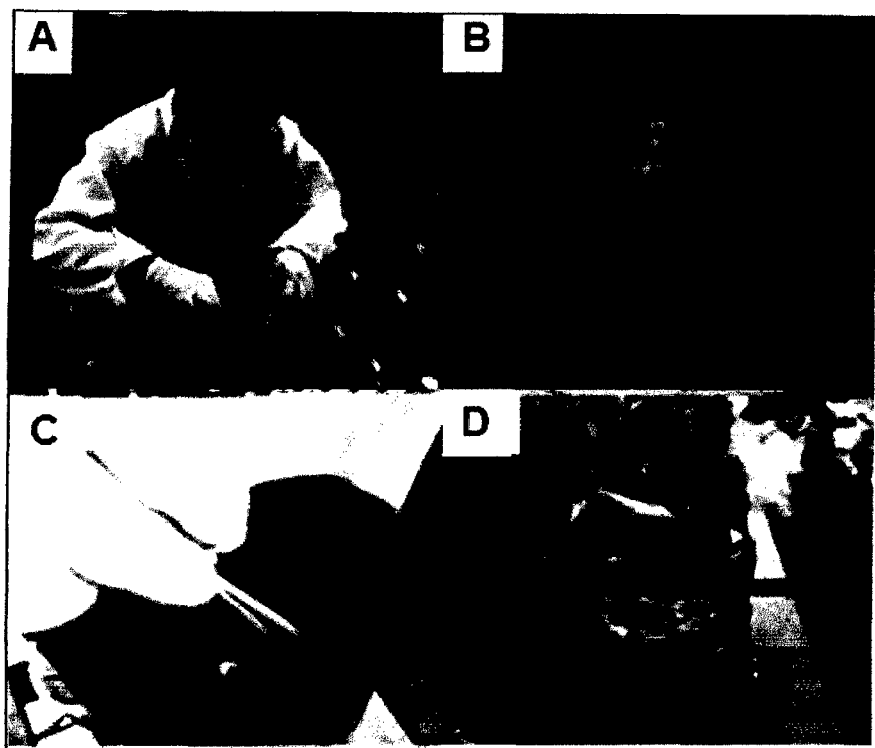


Figura 12. Metodología de siembra de semillas del clon ICS-1 inoculadas con aislamientos de *Trichoderma* endófito. A. Colocación de las semillas colonizadas con aislamientos de *Trichoderma* endófito en sustrato suelo estéril. B. Semilla con medio PSA colonizado con *Trichoderma* endófito. C. cubrimiento se las semillas con suelo estéril. D. Semillas emergidas a los 5 días después de la siembra.

4.10 Inoculación de *Verticillium dahliae*

A partir de placas petri conteniendo cultivos de *Verticillium dahliae* con cuatro días de edad, se obtuvo una suspensión de conidias, para lo cual se utilizó una varilla de vidrio estéril para realizar el raspado de la colonia, y con ayuda de un hematocimetro se realizó el conteo de conidias para uniformizar el inóculo a una concentración de 1×10^7 ufc/cc. Para la inoculación del patógeno se utilizó el método de punción propuesta por (Hanson, 2000), se hizo cuatro heridas en el tallo de cada planta de tres meses de edad; dos cerca del nudo del cotiledón, en lados opuestos; y los otros dos a la altura donde salen las primeras hojas. Después de hacer las heridas con la ayuda de jeringa de 3 ml

y aguja de calibre 22 ambas estéril, se agregó en cada una de las heridas una gota (30 μ l) de la suspensión de 1×10^7 conidias/cc. Uno de los controles fue inoculado con el patógeno y el otro con agua destilada estéril utilizando el mismo método. Por cada tratamiento se tuvo 10 plantas, las cuales después de inoculación fueron incubadas a 25 °C, con luz y manteniéndolas a capacidad de campo (Figura 13). Las evaluaciones de incidencia e índice de severidad, se registraron hasta los 18 días después de la inoculación (DDI) del patógeno, el experimento culminó con el sacrificio de la plantas, y se evaluó altura de planta, longitud radicular y biomasa seca de la planta.

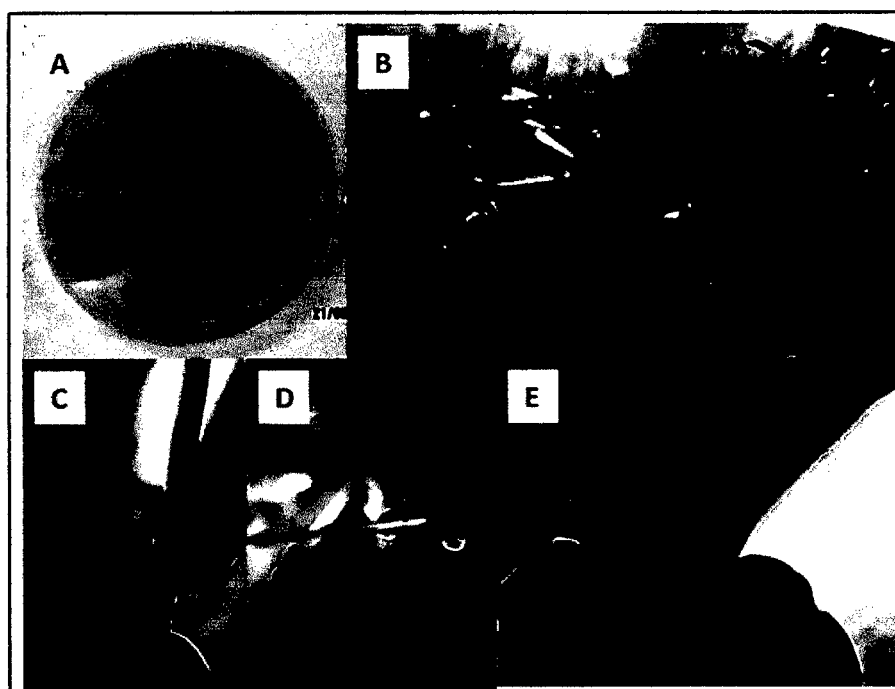


Figura N° 13. Inoculación de *V. dahliae* en plantas de cacao de tres meses de edad. A. Inoculo de *V. dahliae* de tres días de edad. B. Plantones de cacao colonizados con *Trichoderma* endófito de tres meses de edad. C y D. Inoculación de *V. dahliae* por encima de los nudos del cotiledón y E. Primeras hojas.



4.11 Variables de evaluación

4.11.1 Inhibición del crecimiento micelial de *Verticillium dahliae*

Para determinar el porcentaje de inhibición micelial del patógeno se tuvo que medir el radio de crecimiento micelial del patógeno (cm). Para lo cual se dividió en cuatro regiones equidistantes a las placas pequeñas (50x15 mm) y con la ayuda de un vernier desde el centro de cada placa se determinó el radio del crecimiento micelial. Los datos registrados fueron comparados con el control, en el cual *V. dahliae* colonizó toda la placa. Para esto se aplicó la siguiente fórmula:

$$\text{ICM \%} = (\text{CMC} - \text{CMT} / \text{CMC}) * 100$$

Donde:

ICM: % inhibición del crecimiento micelial

CMC: Crecimiento micelial del patógeno en el control (Sin metabolito de *Trichoderma*)

CMT: Crecimiento micelial del patógeno en el tratamiento (Metabolitos de *Trichoderma*).

4.11.2 Porcentaje de colonización de *Verticillium dahliae* por *Trichoderma* spp.

Para evaluar la colonización de *Verticillium dahliae* por *Trichoderma* spp, se tuvo que reaislar 10 discos de cada placa donde se puso en enfrentamiento a los dos hongos. Se contó el número de discos donde creció solo *Trichoderma*, solo *Verticillium dahliae* y ambos; de acuerdo a eso se determinó el porcentaje de colonización del patógeno por aislamientos de *Trichoderma*.

4.11.3 Índice de severidad de la enfermedad

Para determinar el índice de la enfermedad se tuvo que evaluar a cada hoja de cada planta, se examinó periódicamente después de la inoculación los síntomas que mostraban. Estos fueron medidos visualmente en base a la escala de evaluación de 0 a 4 adaptado de Sidhu & Wedster (1977), donde 0; 1; 2; 3 y 4 representa 0%; 1-25%; 26-50%; 51-75% y más del 75% de la reducción del área fotosintética respectivamente. Las evaluaciones fueron registradas a los 12; 14; 16 y 18 días después de la inoculación del patógeno, observando síntomas de marchitamiento y/o necrosamiento. El índice de enfermedad fue calculado como la media del grado de las hojas individuales, mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Índice de la enfermedad} = \frac{\text{Suma del grado de las hojas por planta}}{\text{Número total de hojas por planta}}$$

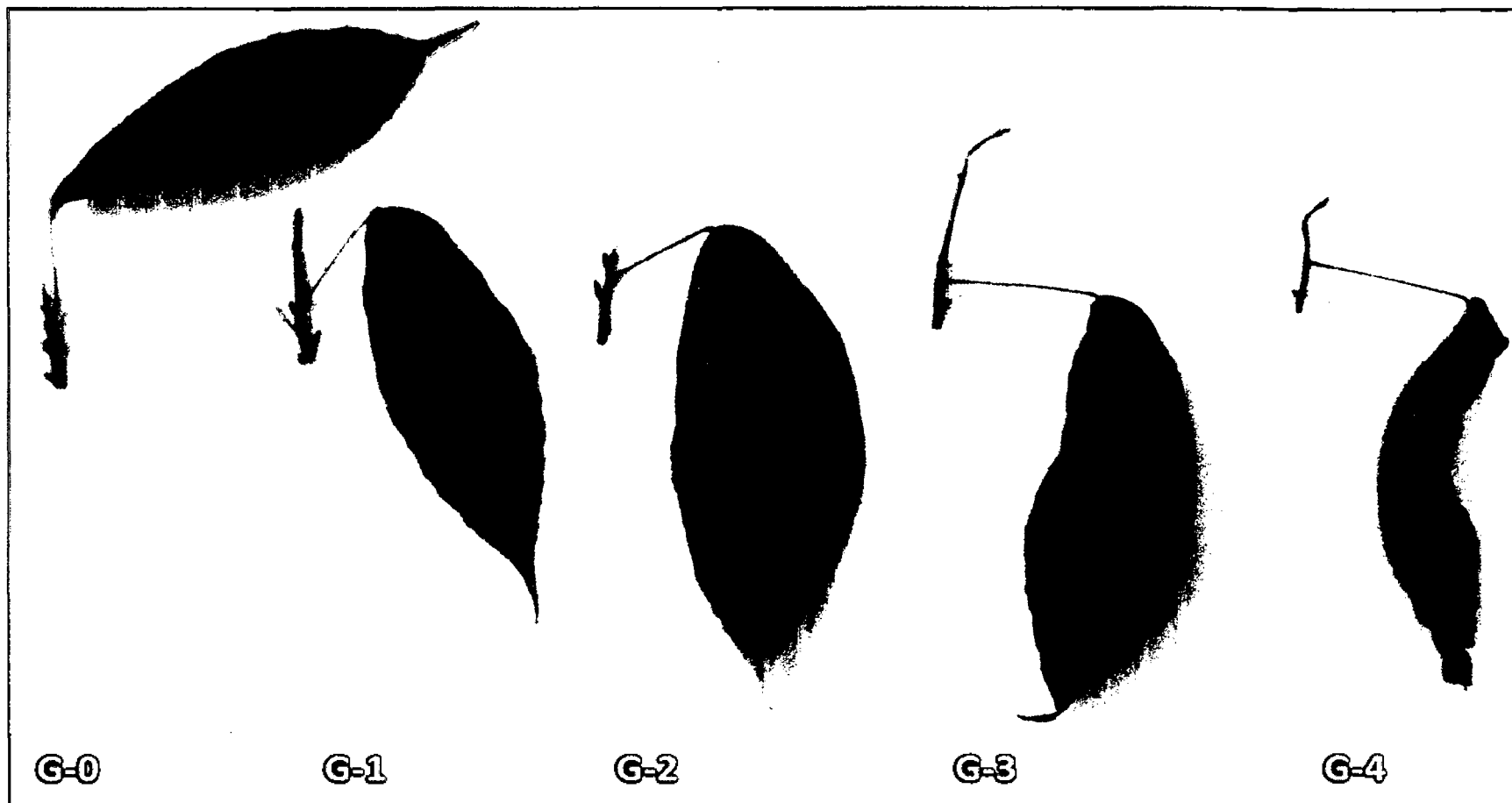


Figura 14: Escala de evaluacion del grado de severidad de la muerte subita causada por *Verticillium dahliae* propuesta por Sidhu & Wedster (1977) evaluadas en hojas de cacao de tres meses, durante los 18 dias despues de la inoculacion del patogeno. **G-0).** Grado cero, no se observan sintomas de marchitamiento. **G-1).** Inclination del pedúnculo de las hojas superiores y juvenes (1-25%). **G-2).** El marchitamiento esta acompañado por sintomas de clorosis y amarillamiento foliar (26-50%). **G-3).** Mas del 50 % de la hoja muestra sintomas de clorosis y arrugamientos (51-75%). **G-4).** Las hojas cloróticas se secan y cae debido al avance de la enfermedad y muerte de la planta (>75%).

4.11.4 Incidencia de la enfermedad

La incidencia se determinó con el número total de plantas enfermas, con respecto al número total de plantas inoculadas con el patógeno *Verticillium dahliae*, las cuales fueron expresadas en porcentaje.

4.11.5 Peso seco de la biomasa

Al término del experimento, que fue a los 18 días después de la inoculación (DDI) del patógeno, se sacrificaron todas las plantas, se separó la parte radicular de la parte aérea (hojas y tallo) y se colocaron en la estufa a 50 °C durante 7 días, posterior a esto en una balanza analítica, se determinó el peso seco (gramos) de las dos partes.

4.11.6 Longitud de raíz

Al final del experimento se tomaron fotografías digitales de las raíces de cada planta, luego estas imágenes se procesaron con el programa de análisis de imágenes ASSESS – Image Analysis Software for Plant Disease Quantification (Lamari, 2002), para determinar la longitud de raíz (cm).

4.11.7 Altura de planta

Antes que las plantas sean sacrificadas, se registró la altura de cada planta (cm), con la ayuda de una regla metálica.

4.12 Diseño experimental

Para las pruebas de biocontrol *in vitro*, se empleó el diseño completamente al azar (DCA). Los datos de inhibición micelial y colonización fueron expresados en porcentaje para ser transformados a arco seno o seno⁻¹ y procesados con el programa INFOSTAT para determinar el ANVA y comparar las medias con la prueba de Duncan al $p=0,01$ de significancia.

En la fase de invernadero con los resultados de incidencia y severidad se determinó el área bajo la curva del progreso de la enfermedad (AUDPC). Aplicando la siguiente fórmula:

$$AUDPC = \sum_{i=1}^{n-1} \{[(Y_i + Y_{(i+1)}) \times (t_{i+1} - t_i)]\}$$

Donde: Y_i = nivel de enfermedad en el tiempo t_i ;

$(t_{(i+1)} - t_i)$ = Tiempo (días) entre dos datos de incidencia

Para los demás parámetros de evaluación altura de planta, longitud de raíz, y peso seco, los datos fueron procesados con el programa INFOSTAT para determinar el ANVA y la prueba de rango múltiples Duncan, al $p=0,01$ de significancia.

V. RESULTADOS

5.1 Prueba de biocontrol *in vitro*:

5.1.1 Prueba de antibiosis

Cuadro 3

Análisis de Varianza del porcentaje de inhibición micelial de *Verticillium dahliae* en presencia de metabolitos secundarios de aislamientos de *Trichoderma* endófito.

F.V.	SC	GL	CM	F	p-valor
Tratamientos	40101,17	23	1743,53	66,5	<0,0001
Error	1258,42	48	26,22		
Total	41359,6	71			
CV= 15,18 %			R ² = 97 %		

Cuadro 4

Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *Verticillium dahliae* en medio PSA conteniendo metabolitos secundarios de aislamientos de *Trichoderma* endófito.

Numero	Aislamiento	% Inhibición	Diferencias significativa*							
1	TE-91	100,00	a							
2	TE-83	100,00	a							
3	TE-84	100,00	a							
4	TE-7	61,21		b						
5	TE-20	60,49		b						
6	TE-50	39,10			c					
7	TE-3	26,63				d				
8	TE-18	25,86				d				
9	TE-105	25,61				d				
10	TE-102	23,64				d	e			
11	TE-22	20,84				d	e	f		
12	TE-67	19,34				d	e	f	g	
13	TE-56	19,21				d	e	f	g	
14	TE-54	17,74				d	e	f	g	h
15	TE-17	16,20				d	e	f	g	h
16	TE-6	14,69				d	e	f	g	h
17	TE-108	13,42				d	e	f	g	h
18	TE-72	11,51					e	f	g	h
19	TE-81	10,22					e	f	g	h
20	TE-116	8,49						f	g	h
21	TE-87	7,58						f	g	h
22	TE-97	6,82							g	h
23	TE-74	5,48								h
24	TE-39	4,32								h

* Promedios de 9 repeticiones. Letras distintas indican diferencias significativas, según la prueba de rango múltiple Duncan ($p \leq 0.01$).

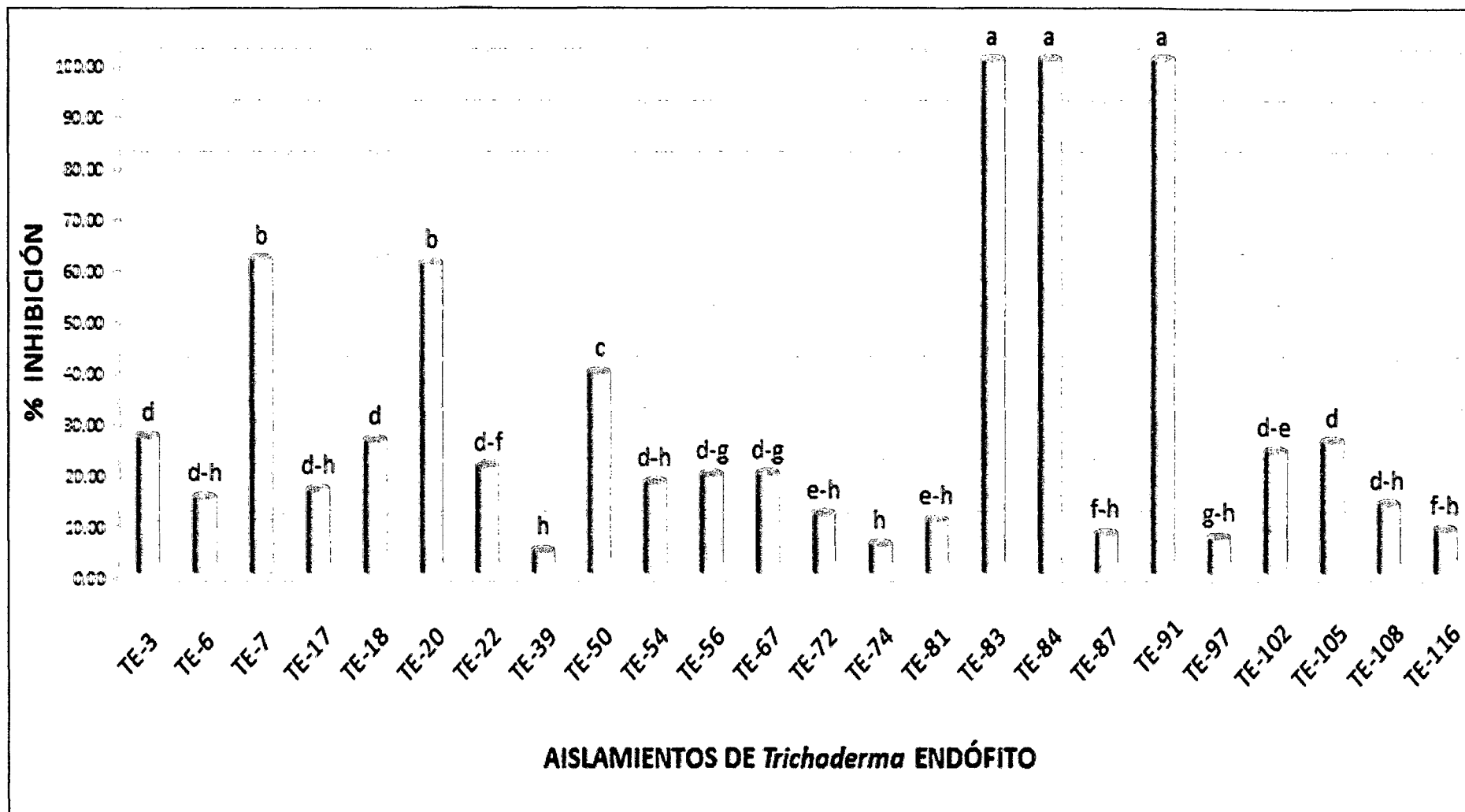


Figura 15: Efecto de los metabolitos secundarios de aislamientos de *Trichoderma* endófito en la inhibición micelial de *Verticillium dahliae*. Letras distintas indican diferencias significativas, según la prueba de rango múltiple Duncan ($p \leq 0.01$).

5.1.2 Prueba de micoparasitismo

Cuadro 5

Análisis de varianza del porcentaje de colonización de aislamientos

***Trichoderma* endófito hacia *Verticillium dahliae*.**

F.V.	SC	GL	CM	F	p-valor
Tratamientos	79499,39	23	3456,5	20,78	<0,0001
Error	7983,11	48	166,31		
Total	87482,5	71			
C.V= 22,52 %			R ² = 89 %		

Cuadro 6

Porcentaje de colonización de aislamientos de *Trichoderma* hacia *Verticillium dahliae*.

Numero	Aislamiento	% Colonización	Diferencias significativa*				
1	TE-7	100.00	a				
2	TE-56	100,00	a				
3	TE-54	100,00	a				
4	TE-83	100,00	a				
5	TE-91	100,00	a				
6	TE-87	100,00	a				
7	TE-84	100,00	a				
8	TE-20	100,00	a				
9	TE-116	100,00	a				
10	TE-108	100,00	a				
11	TE-102	100,00	a				
12	TE-6	63,33		b	c		
13	TE-72	56,67		b	c		
14	TE-105	53,33		b	c		
15	TE-67	53,33		b	c		
16	TE-17	50,00		b	c		
17	TE-22	50,00		b	c		
18	TE-39	40,00		b	c		
19	TE-3	40,00		b	c		
20	TE-97	30,00		b	c	d	
21	TE-50	20,00		b	c	d	
22	TE-18	10,00			c	d	
23	TE-81	0,00					d
24	TE-74	0,00					d

* Promedio de 3 repeticiones, donde letras distintas indican diferencias significativas, según la prueba de rango múltiple Duncan ($p \leq 0,01$).

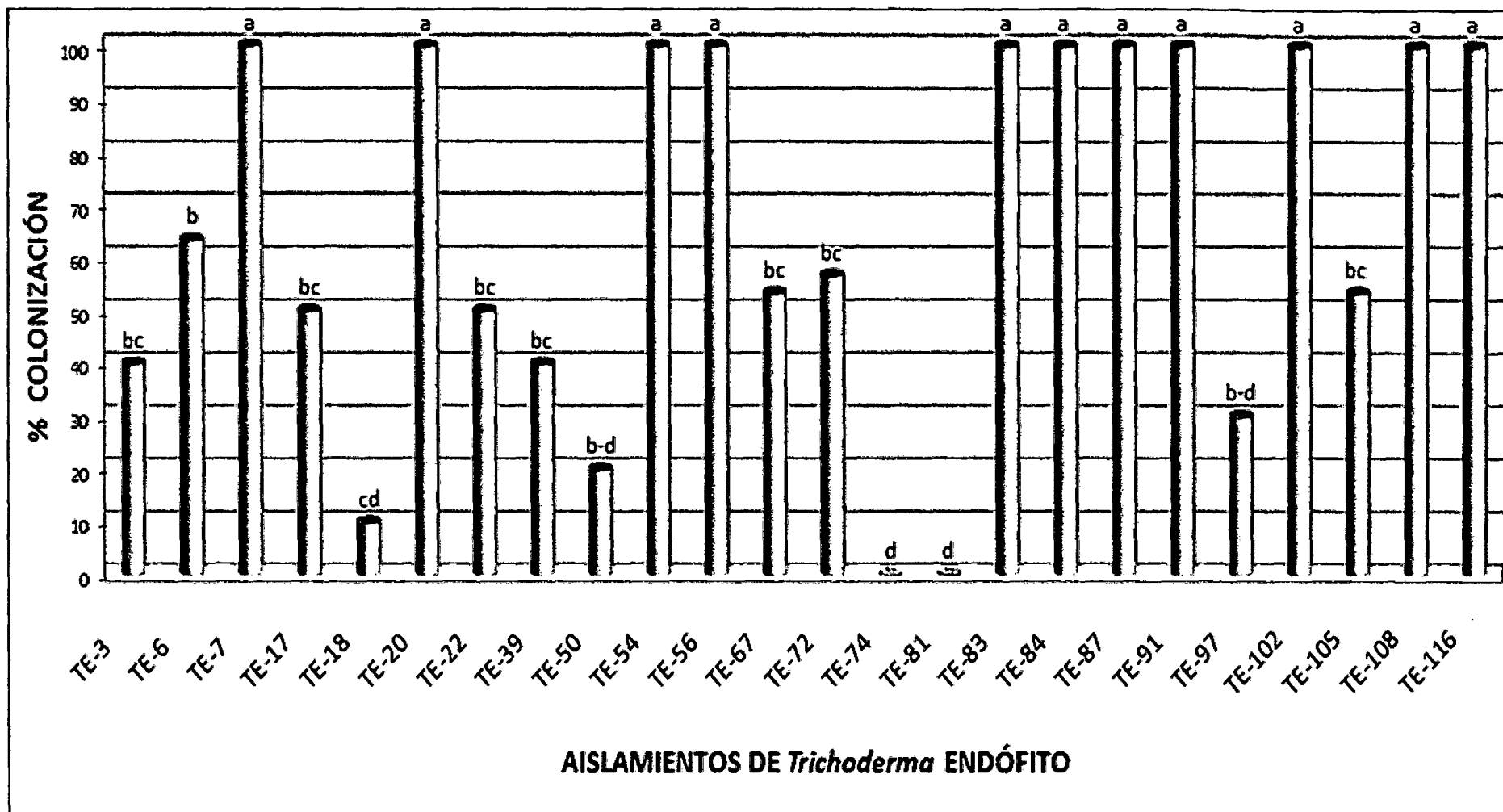


Figura 16: Efectos de aislamientos de *Trichoderma* endófito en el porcentaje de colonización de *Verticillium dahliae*. Letras distintas indican diferencias significativas, según la prueba de rango múltiple Duncan ($p \leq 0,01$).

5.2 Prueba de biocontrol en invernadero:

5.2.1 Incidencia

Cuadro 7

Análisis de varianza del porcentaje de incidencia de la muerte súbita causada por *Verticillium dahliae* en plantas de cacao de tres meses de edad colonizadas con aislamientos de *Trichoderma* endófito.

F.V.	SC	GL	CM	F	p-valor
Tratamientos	17458,85	8	2182,36	9,53	<0,0001
Error	4120,37	18	228,91		
Total	21579,22	26			
CV= 7,23 %			R ² = 59 %		

Cuadro 8

Incidencia (%) de la muerte súbita causada por *Verticillium dahliae* en plantas de cacao colonizadas con aislamientos de *Trichoderma* endófito

Tratamientos	Aislamientos ^a	% Incidencia ^b	Significancia	AUDPC ^c
T1	TE-3	50	ab*	260
T2	TE-7	40	ab	270
T3	TE-54	20	a	130
T4	TE-84	80	bc	420
T5	TE-87	80	bc	400
T6	TE-91	90	bc	365
T7	TE-97	90	bc	490
T8	TE-108	80	bc	370
T9	CONTROL ^d	100	c	660

^a Aislamientos de *Trichoderma* endófito inoculadas en semillas de cacao.

^b Incidencia de la enfermedad muerte súbita causada por *Verticillium dahliae*, después de 18 DDI del patógeno (final del experimento), expresadas en porcentajes, con 10 repeticiones por aislamiento.

^c Área bajo la curva del progreso de la enfermedad (AUDPC) del porcentaje de incidencia, resultado de la sumatoria de AUDPC de las fechas evaluadas durante 18 DDI del patógeno, calculado mediante la siguiente formula:

$$AUDPC = \sum_{i=1}^{n-1} \{ [(Y_i + Y_{(i+1)}) \times (t_{i+1} - t_i)] \}$$
, en donde Y_i = porcentaje de incidencia observados; t_i = tiempo (días entre cada evaluación).

^d Tratamiento testigo donde no se inoculó *Trichoderma* endófito, pero si al patógeno.

* Letras distintas indican diferencias significativas, según la prueba de rango múltiple Duncan ($p \leq 0,01$).

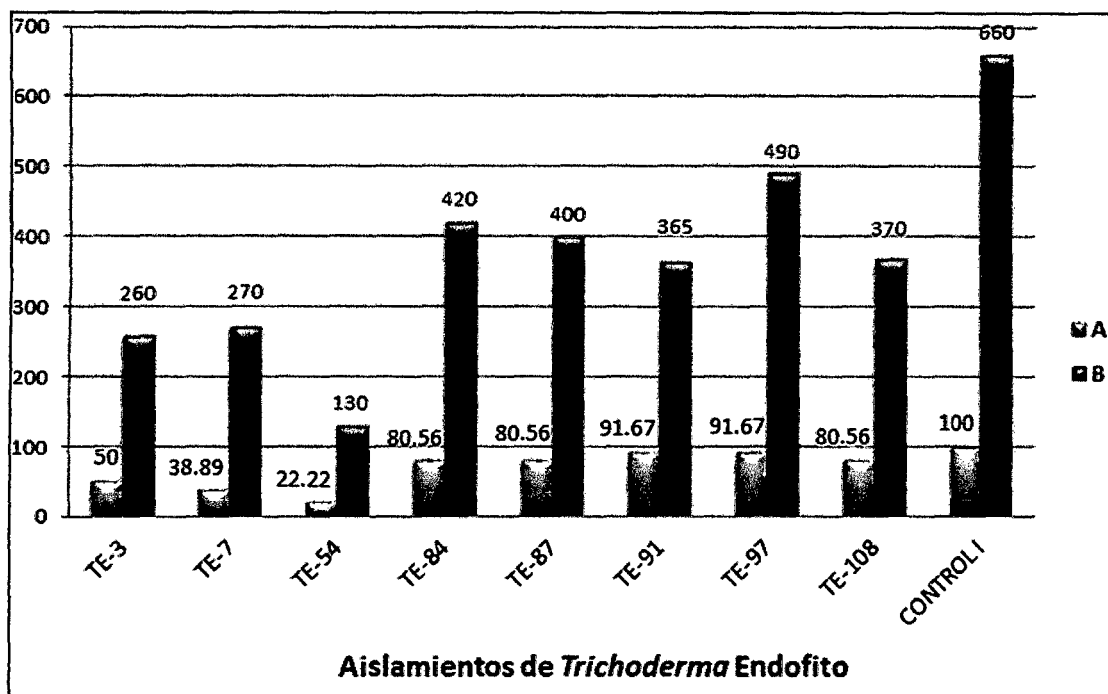


Figura 17: Relación comparativa del porcentaje de incidencia y AUDPC de la muerte subita, en plantas de cacao de tres meses de edad, colonizadas con aislamientos de *Trichoderma* endofito, 18 DDI del patógeno. **A).** Porcentaje de incidencia de la muerte subita causada por *Verticillium dahliae*. **B).** Valores del AUDPC del porcentaje de incidencia.

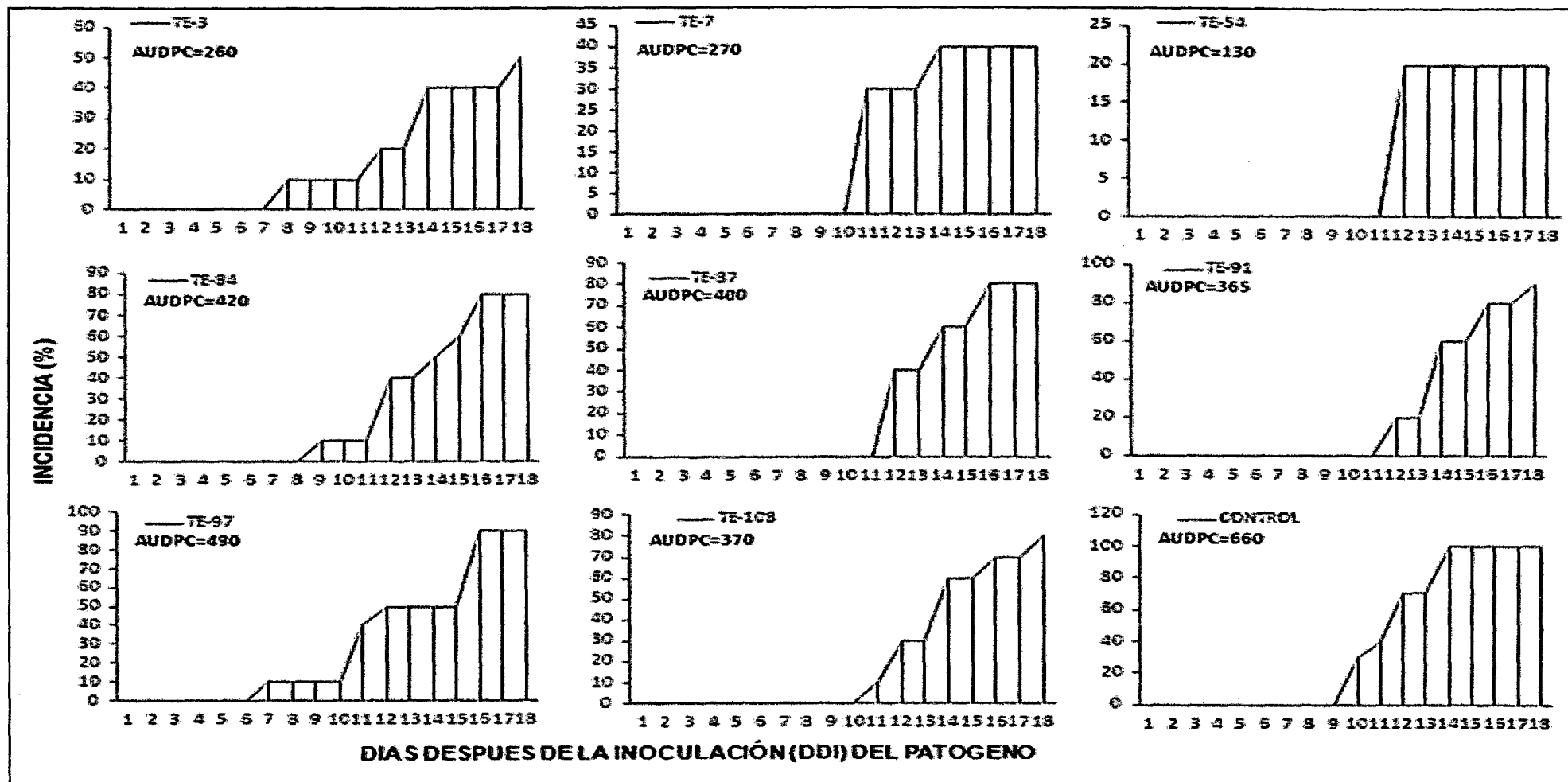


Figura 18: Area bajo la curva del Progreso de la enfermedad (AUDPC) del porcentaje de incidencia de la muerte súbita, desde 7 DDI (aparición de los síntomas) hasta los 18 DDI (Final del experimento) de *Verticillium dahliae*, en plantas de cacao de tres meses de edad, colonizadas con ocho aislamientos de *Trichoderma* endófito y un tratamiento Control.

5.2.2 Severidad

Cuadro 9

Análisis de varianza del porcentaje de severidad de la muerte súbita causada por *Verticillium dahliae* en plantas de cacao de tres meses de edad colonizadas con aislamientos de *Trichoderma* endófito.

F.V.	SC	GI	CM	F	p-valor
Tratamientos	3749,8	8	468,72	9,09	0,0001
Error	928,11	18	51,56		
Total	4677,91	26			
CV= 24,37 %			R ² = 80 %		

Cuadro 10

Severidad de la muerte súbita causada por *Verticillium dahliae* en plantas de cacao colonizadas con aislamientos de *Trichoderma* endófito.

Tratamientos	Aislamientos ^a	Grado de severidad ^b	Porcentaje de severidad ^c		AUDPC ^d
T1	TE-3	1,28 abc	23,92	abc	66,48
T2	TE-7	1,19 ab	22,79	ab	100,14
T3	TE-54	0,70 a	13,06	a	54,32
T4	TE-84	2,04 bcd	37,54	bcd	111,87
T5	TE-87	2,28 cd	44,31	cd	128,87
T6	TE-91	1,72 bc	29,76	bc	89,15
T7	TE-97	2,13 bcd	38,05	bcd	141,13
T8	TE-108	1,66 bc	27,91	abc	80,55
T9	Control ^e	3,06 d	59,82	d	226,72

^a Aislamientos de *Trichoderma* endófito inoculadas en semillas de cacao.

^b Medias del Grado de severidad muerte súbita, evaluados en una escala de 1-4.

^c Medias del porcentaje de severidad de la muerte súbita causada por *Verticillium dahliae*, 18 DDI del patógeno (fin del experimento).

^d Área bajo la curva del progreso de la enfermedad (AUDPC) del porcentaje de severidad, resultado de la sumatoria del AUDPC de 4 fechas de evaluación (12, 14 16 y 18 DDI) calculado con la siguiente formula:

$AUDPC = \sum_{i=1}^{n-1} \{[(Y_i + Y_{(i+1)}) \times (t_{i+1} - t_i)]\}$, en donde Y_i = porcentaje de incidencia observados; t_i = tiempo (días entre cada evaluación).

^e Tratamiento testigo donde no se inoculó *Trichoderma* endófito, pero si al patógeno.

* Letras distintas indican diferencias significativas, según la prueba de rango múltiple Duncan ($p \leq 0,01$).

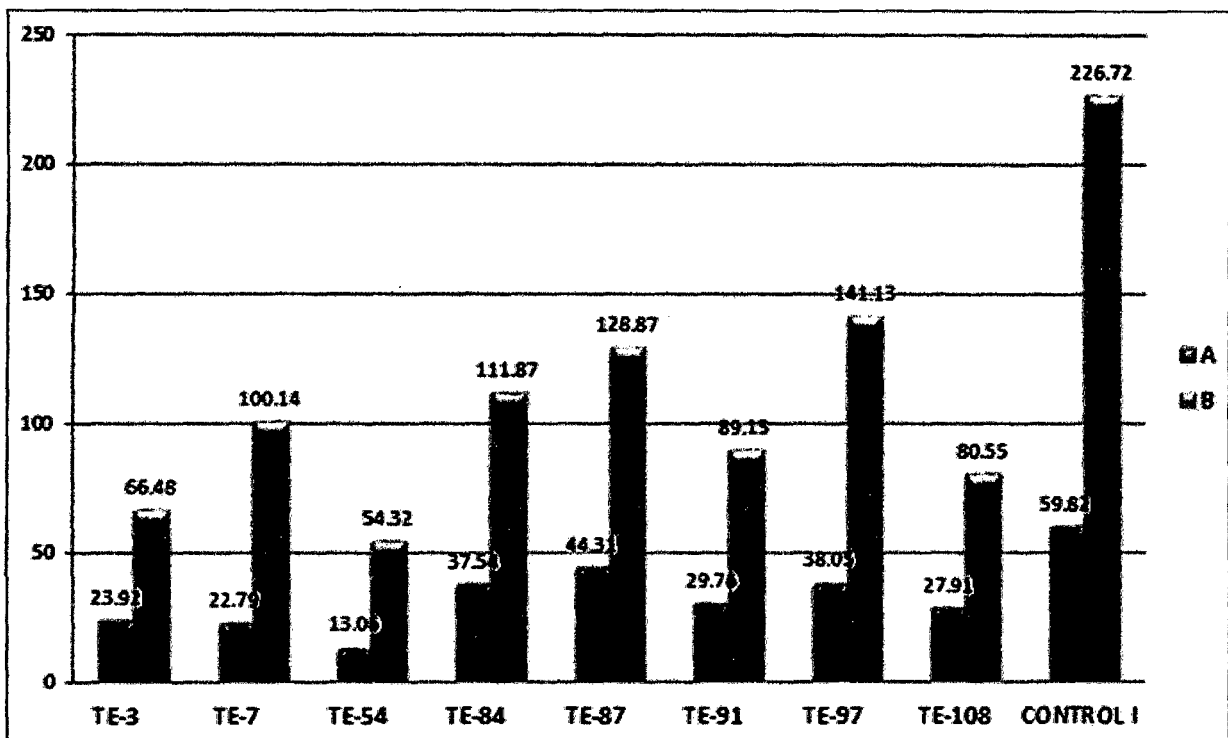


Figura 19: Relacion comparativa del porcentaje de severidad de la muerte súbita y AUDPC, en plantas de cacao, colonizadas con aislamientos de *Trichoderma* endofito y un Control. **A).** Porcentaje de severidad de la muerte súbita en plantas de tres meses de edad, 18 días despues de inoculacion del patogen. **B).** AUDPC del porcentaje de severidad.

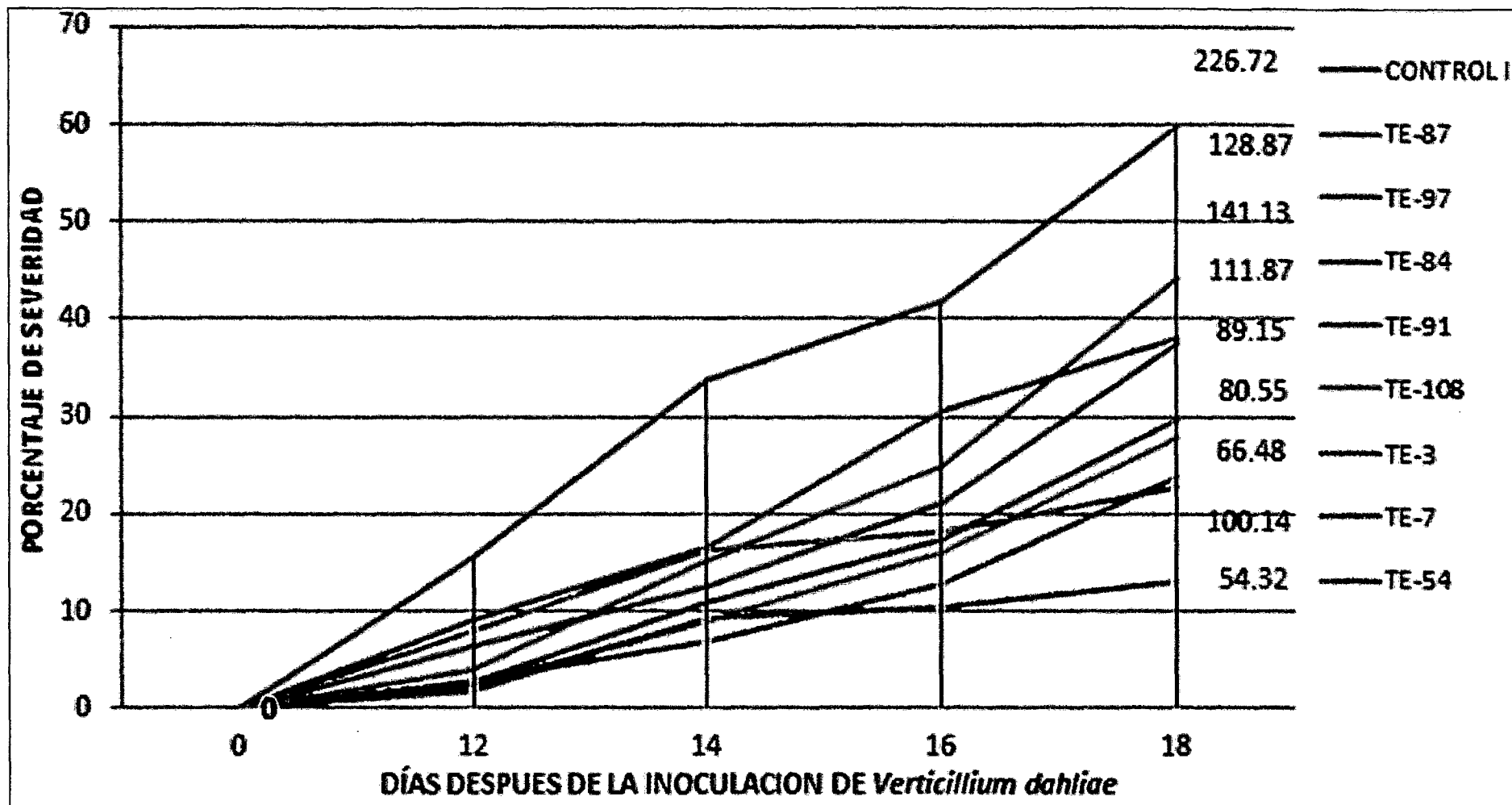


Figura 20: Area bajo la curva del Progreso de la enfermedad (AUDPC) del porcentaje de severidad de la muerte súbita causada por *Verticillium dahliae*, hasta los 18 días después de la inoculación (DDI) del patógeno, en plantas de cacao de tres meses de edad, colonizadas con ocho aislamientos de *Trichoderma* endófito y un tratamiento Control. Evaluaciones registradas a los 12, 14, 16 y 18 DDI.

5.2.3 Longitud de raíz:

Cuadro 11

Análisis de Varianza de longitud de raíces determinadas en platas de cacao de tres meses de edad, colonizadas con aislamientos de *Trichoderma* endófito, 18 DDI del patógeno.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Tratamientos	102,61	9	11,4	3,5	0,0094
Error	65,17	20	3,26		
Total	167,78	29			
CV= 5,88 %			R ² = 61 %		

Cuadro 12

Longitud de raíz (cm) de plantas de cacao de tres meses de edad colonizados con aislamientos de *Trichoderma* endófito, 18 DDI de *Verticillium dahlia*.

Aislamientos ^a	Longitud (Cm) ^b	Significancia
TE-3	910,99	abc*
TE-7	788,28	bc
TE-54	939,97	abc
TE-84	1074,79	a
TE-87	983,29	ab
TE-91	1046,2	a
TE-97	1010,6	a
TE-108	731,64	c
CONTROL I ^c	1057,16	a
CONTROL II ^d	1049,99	a

- ^a Aislamientos de *Trichoderma* endófito, inoculadas en semillas de cacao
- ^b Longitud de raíz expresadas en centímetros, de plantas sacrificadas a los 18 días después de la inoculación del patógeno y determinadas con el programa ASSES.
- ^c Tratamiento donde no fue inoculado con *Trichoderma* endófito, pero si con el patógeno.
- ^d Tratamiento donde no se inóculo ninguno de los dos hongos.
- * Letras distintas indican diferencias significativas, según la prueba de rango múltiple Duncan ($p \leq 0,01$).

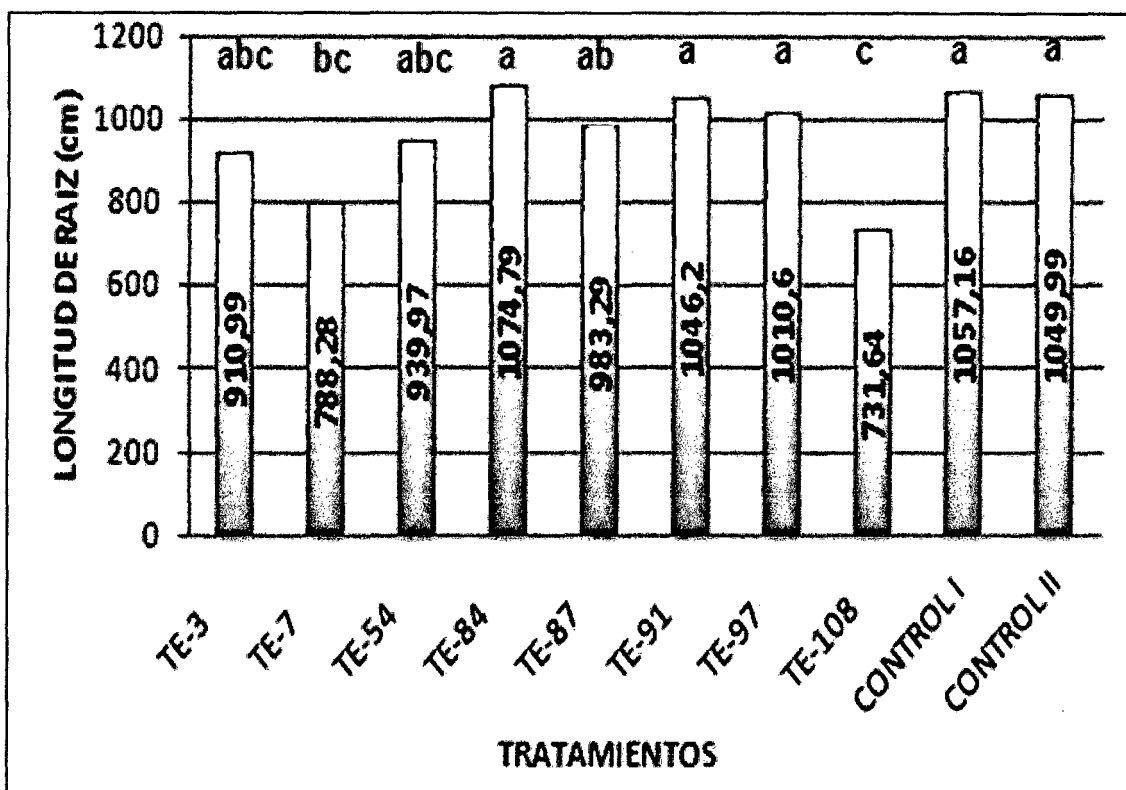


Figura 21: Longitud de raíz en centímetros de plantas de cacao de tres meses de edad colonizadas con aislamientos de *Trichoderma* endófitos, 18 DDI de *Verticillium dahliae*. Letras distintas indican diferencias significativas, según la prueba de Duncan ($p \leq 0,01$).

5.2.4 Altura de planta:

Cuadro 13

Análisis de varianza de la altura de planta en cacao de tres meses de edad, colonizadas con aislamientos de *Trichoderma* endófito, 18 DDI del patógeno.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Tratamientos	0,2	9	0,02	0,5	0,859
Error	0,9	20	0,05		
Total	1,11	29			
CV= 3,68 %			R ² = 18 %		

Cuadro 14

Altura de planta (cm) en cacao de tres meses de edad colonizadas con aislamientos de *Trichoderma* endofito a los 18 DDI de *Verticillium dahlia*.

Tratamientos ^a	Altura (cm) ^b	Significancia
TE-3	33,10	a*
TE-7	32,84	a*
TE-54	34,15	a*
TE-84	33,74	a*
TE-87	34,19	a*
TE-91	32,82	a*
TE-97	32,98	a*
TE-108	31,19	a*
CONTROL I ^c	32,25	a*
CONTROL II ^d	31,46	a*

- ^a Aislamientos de *Trichoderma* endófito, inoculadas en semillas de cacao
- ^b Altura de planta determinadas a los 18 días después de la inoculación del patógeno.
- ^c Tratamiento donde no fue inoculado con *Trichoderma* endófito, pero si al patógeno.
- ^d Tratamiento donde no se inóculo ninguno de los dos hongos.
- * Letras distintas indican diferencias significativas, según la prueba de rango múltiple Duncan ($p \leq 0,01$).

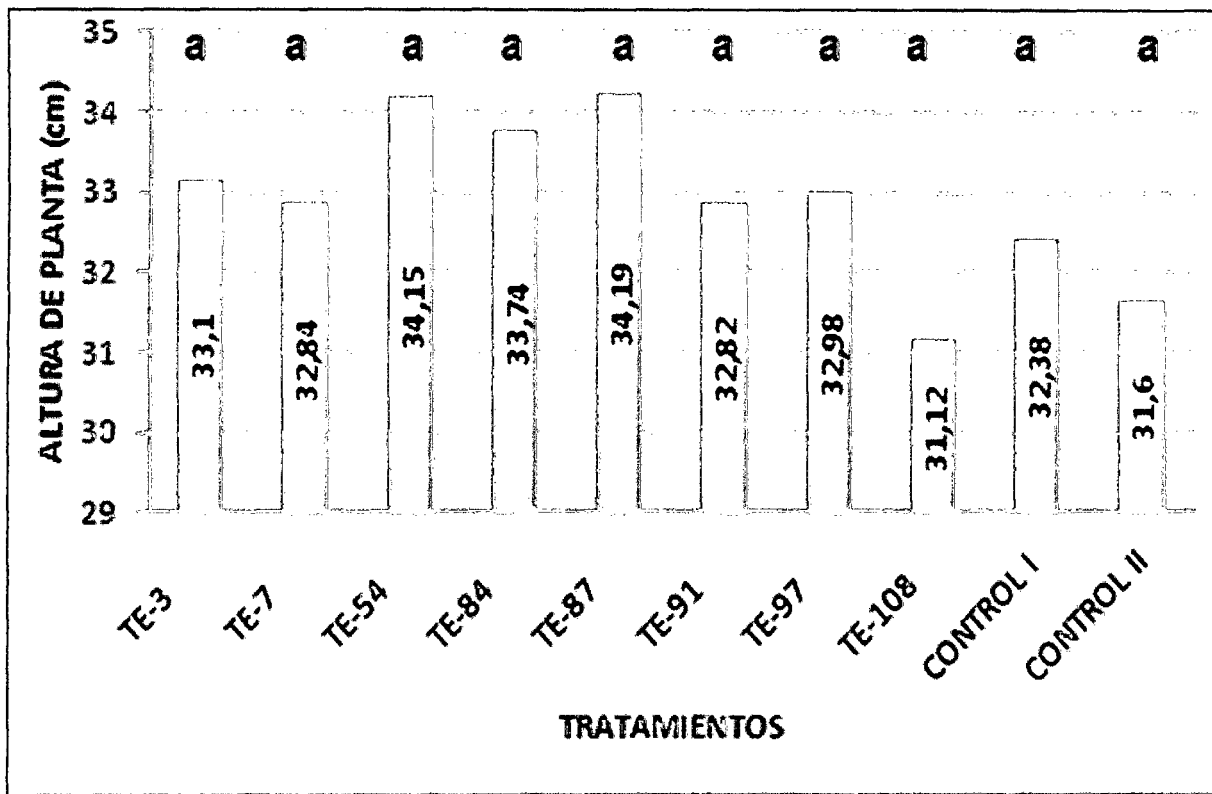


Figura 22 : Valores promedios de 10 repeticiones, de la altura (cm) en plantade cacao de tres meses edad colonizadas con aislamientos de *Trichoderma* endofito, a los 18 DDI de *Veticillium dahliae*.

5.2.5 Biomasa seca de plantas de cacao

Cuadro 15

Análisis de varianza del peso seco aéreo y raíz de plantas de cacao de tres meses de edad, colonizadas con aislamientos de *Trichoderma* endófito, 18 DDI del patógeno.

PESO SECO	F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	C.V	R ²
PS-A	Tratamientos	0,22	9	0,02	4,06	0,0044	3,84%	65%
	Error	0,12	20	0,01				
	Total	0,35	29					
PS-R	Tratamientos	0,13	9	0,01	3,12	0,0162	5,56%	58%
	Error	0,09	20	4,70E-03				
	Total	0,23	29					

Cuadro 16

Biomasa seca de plantas de cacao de tres meses de edad, colonizadas con aislamientos *Trichoderma* endófito, después de 18 DDI de *Verticillium dahliae*.

Tratamientos ^a	Peso seco en planta			
	PS-A ^b		PS-R ^c	
TE-3	3,99*	ab	1,18*	ab
TE-7	3,17*	c	0,80*	c
TE-54	3,60*	bc	1,21*	ab
TE-84	3,49*	bc	0,89*	bc
TE-87	3,67*	bc	0,84*	c
TE-91	3,83*	b	0,99*	abc
TE-97	3,40*	bc	1,16*	ab
TE-108	3,72*	bc	0,93*	abc
CONTROL I ^d	3,71*	bc	1,03*	bc
CONTROL II ^e	4,54*	a	1,31*	a

^a Aislamientos de *Trichoderma* endófito, inoculadas en semillas de cacao

^b Peso seco de la parte aérea (hojas y tallo) de la planta, con valores expresados en gramos.

^c Peso seco de la raíz de plantas de cacao, con valores expresados en gramos.

^d Tratamiento donde no fue inoculado *Trichoderma* endófito, pero si el patógeno.

^e Tratamiento Control II donde no se inóculo ninguno de los dos hongos

* Letras distintas indican diferencias significativas, según la prueba de rango múltiple Duncan ($p \leq 0,01$).

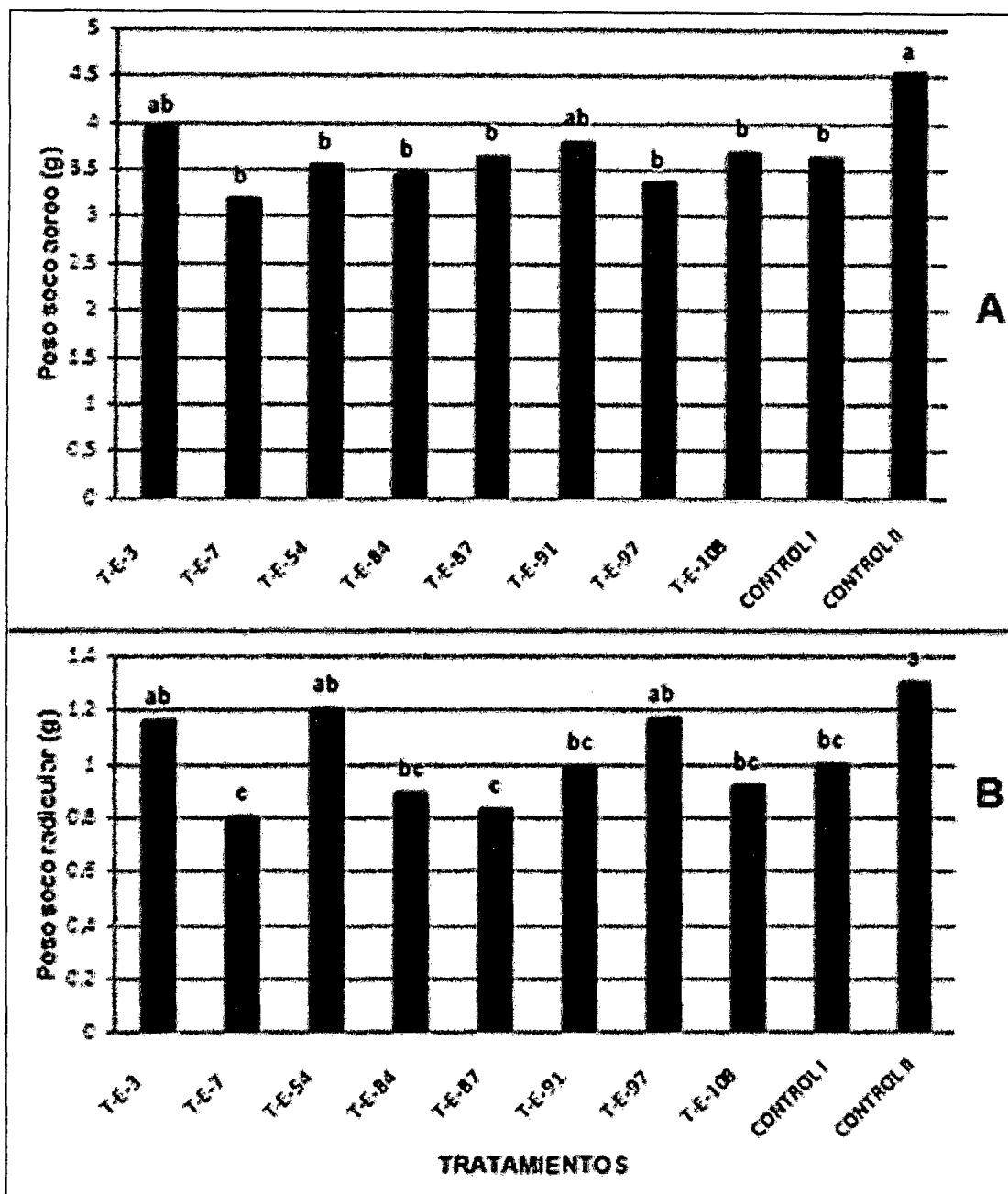


Figura 23 : Biomasa seca de la parte aérea y raíz de plantas de cacao de tres meses de edad, colonizadas con aislamientos de *Trichoderma* endófito, a los 18 DDI de *Verticillium dahliae*. A). Peso seco aéreo PS-A. B). Peso seco radicular PS-R. Letras distintas indican diferencias significativas, según la prueba de Duncan ($p \leq 0,01$).

VI. DISCUSIÓN

6.1 Capacidad antagónica *in vitro* de aislamientos de *Trichoderma* endófito sobre *Verticillium dahliae*.

El cuadro 4 indica el análisis de varianza del porcentaje de inhibición micelial de *Verticillium dahliae* en presencia de metabolitos secundarios de aislamientos de *Trichoderma* endófito (TE), donde existe diferencia significativa entre aislamientos con un nivel de significancia de 0,01 y con un coeficiente de variabilidad de 15,18. Así mismo, el cuadro 3 y la figura 15 muestran el efecto de los metabolitos secundarios de aislamientos de TE en la inhibición del crecimiento micelial de *Verticillium dahliae*, en la cual se observa que los metabolitos obtenidos de TE-83, TE-84 y TE-91 inhibieron completamente el crecimiento de *Verticillium dahliae* (100%) y no muestran diferencia significativas entre ellos, diferenciándose estadísticamente de los demás aislamientos, seguido por TE-7 y TE-20 con 61,21 y 60,49% de inhibición respectivamente, sin diferencia estadística entre ellos. Así mismo, el aislamiento TE-50 con 39,1% se diferencia de los demás, superando al TE-3, TE-18 y TE-105 los cuales son estadísticamente iguales con 26,63%, 25,86% y 25,61% respectivamente; del mismo modo, el aislamiento TE-102 con 23,64% superó a los aislamientos TE-22, TE-67, TE-56, TE-54, TE-17, TE-6 y TE-108, los cuales son numéricamente diferentes pero estadísticamente iguales, con 20,84%; 19,34%; 19,21%; 17,74%; 16,20%; 14,69% y 13,42% respectivamente. Sin embargo, los valores más bajos lo presentaron los

metabolitos obtenidos de TE-74 y TE-39 con 5,48% y 4,32 % respectivamente, siendo estadísticamente iguales.

Los resultados obtenidos de la prueba de antibiosis muestran que todos los aislamientos de *Trichoderma*, redujeron el crecimiento micelial del patógeno *Verticillium dahliae*; probablemente esto se deba por la actividad enzimática que presentan estos aislamientos hacia el patógeno; así como menciona Jakobs *et al.*, (1991), muchas especies del genero *Trichoderma* son agentes de control biológico potenciales contra un gran número de enfermedades. Entre las enzimas líticas que producen las especies de *Trichoderma*, se reportan a las quitinasas, glucanasas (Bruce *et al.*, 1995; Benhamou y Chet, 1997), proteasas y celulasas; algunas están relacionadas con el fenómeno de antibiosis y micoparasitismo al degradar la pared celular y micoparasitar al hospedante (Schickler y Chet, 1997).

Además los resultados indican que los aislamientos de *Trichoderma* TE-83, TE-84 y TE-91, son los que inhibieron totalmente el crecimiento del patógeno *V. dahliae* superando a los demás. Semejantes resultados fueron obtenidos por Jabnoun-Khiareddine *et al.*, (2009), sobre reducción del crecimiento radial de tres especies de *Verticillium* (*V. dahlia*, *V. tricornis* y *V. albo-atrum*) con tres especies de *Trichoderma* (*T. virens*, *T. viride* y *T. harzianum*).

Además otros aislamientos fueron muy efectivos en el control del patógeno como TE-7 y TE-20 con 61,21% y 60,49% respectivamente. Las especies de

Trichoderma, tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de ciertos hongos fitopatógenos, como menciona Montealgre y Henríquez (1990), en donde *T. harzianum* presentó un mayor valor de inhibición sobre *Sclerotium rolfsii* en pruebas *in vitro*. Así mismo en otros resultados reportados por Henni (1987), D'Ercole *et al.* (2000), Rafai *et al.* (2003) y Regragui (2005), concerniente a la actividad antagónica de *T. harzianum* contra *V. dahliae*; y en otros trabajos de Rafai *et al.*, (2003) concerniente a *T. hamatum* y *T. harzianum* contra algunos patógenos de tomate, donde los metabolitos producidos por estas dos especies lograron reducir significativamente la esporulación, la germinación de las conidias y la longitud del tubo germinativo de *V. dahliae* y otros patógenos de tomate tales como *F. oxysporium* f. sp. *lycopersici* y *Alternaria solani*. Similares resultados fueron reportados por Santamarina *et al.*, (2006), en estudios *in vitro*, sobre *T. harzianum* inhibiendo el desarrollo de *R. solani* y *V. dahliae*; el mismo autor menciona que la cepa de *T. harzianum* es un agente de control biológico potencial. En particular *Trichoderma harzianum*, es la especie con más amplio espectro de control, bajo diferentes condiciones ambientales (Migheli *et al.*, 1995). Lorito *et al.*, (1994), también corrobora este reporte, quien indica que la actividad quitinolítica y glucanolítica de *T. harzianum* parecen estar biológicamente más activas y efectivas que otras enzimas de otras fuentes, contra un amplio rango de hongos, inhiben totalmente las esporas de varios hongos fitopatógenos, entre ellos, *Botrytis cinerea*, *Fusarium solani*, *F. graminearum* y *P. ultimum*, a concentraciones de 200-300 mg/ml⁻¹ (Punja y Zhang, 1993).

En la prueba de micoparasitismo, el cuadro 6 muestra el análisis de varianza del porcentaje de colonización de *Trichoderma* endófito hacia *Verticillium dahliae*, donde se observa que existe diferencia significativa entre aislamientos de *Trichoderma* con un nivel de significancia de $p=0,01$ y con coeficiente de variabilidad de 22,52. Así mismo, según la prueba de Duncan el cuadro 5 y la figura 16 muestran las diferencias de medias del porcentaje de colonización de aislamientos de *Trichoderma* endófito en placas pre-colonizadas por *Verticillium dahliae*, donde se observan que 22 aislamientos de *Trichoderma* resultaron ser micoparásitos de *V. dahliae*, con valores obtenidos entre 10 y 100 % de colonización, siendo 11 aislamientos (TE-7, TE-84, TE-91, TE-20, TE-83, TE-102, TE-56, TE-108, TE-116, TE-54 y TE-87) micoparásitos agresivos, con 100% de colonización al patógeno, seguido de los aislamientos TE-6, TE-72, TE-105, TE-67, TE-17, TE-22, TE-39 y TE-3 con valores comprendidos entre 63,33 y 40% de colonización al patógeno, comportándose estadísticamente iguales entre ellos, pero superando a los aislamientos TE-97 y TE-50 con valores de 30 y 20% respectivamente. El aislamiento TE-18 fue el que tuvo menor efecto en la colonización hacia el patógeno. Mientras que los aislamientos que no tuvieron ningún efecto en la colonización del patógeno, fueron TE-81 y TE-74.

En la prueba de micoparasitismo se determinó la capacidad de los aislamientos de *Trichoderma* endófito de colonizar colonias de *Verticillium dahliae*, mediante la reducción del crecimiento del patógeno, para luego micoparasitar a *Verticillium dahliae*.

Los resultados muestran que los aislamientos que mejor colonizaron a *V. dahliae* fueron TE-7, TE-20, TE-54, TE-56, TE-83, TE-84, TE-91, TE-87, TE102, TE-108 y TE-116, quienes micoparasitaron al 100% al patógeno. En este caso *Trichoderma* se comportó como un eficiente hiperparásito hacia *Verticillium dahliae*. Probablemente esto se deba a que *Trichoderma* tiene una gran capacidad parasítica contra una amplia gama de patógenos, incluyendo *Verticillium dahliae*, esto coincide con lo reportado por Martins-Corder y Melo, 1998; quienes reportan que en pruebas *in vitro* *Trichoderma viride* y *Trichoderma koningi* mostraron un alto potencial antagónico hacia *V. dahliae* compitiendo por sustrato e hiperparásito. El mismo autor menciona que *Trichoderma* spp., causa la degradación de las hifas del hospedante través de la secreción de metabolitos tóxicos inhibiendo o desenvolviendo a *V. dahliae*, cuando se establece un contacto íntimo entre las hifas, el antagonista enrolla al hospedante, formando estructuras semejantes a ganchos, causando la destrucción de la pared celular, para obtener nutrientes a partir de las células muertas. Así mismo, Melo, 1991; Chet y Henis, 1985; menciona que las especies de *Trichoderma* pueden parasitar también microesclerosios, que son estructuras de resistencia producidas por *V. dahliae*. En otros estudios hecho por Reithner *et al.*, (2005) y (Hoyos *et al.*, 2008), mencionan que *Trichoderma* spp., son capaces de reconocer y atacar patógenos de plantas como *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium graminearum*, *Phytophthora* spp, *Pythium* spp., y *Sclerotinia* spp., con alta capacidad antagónica en niveles *in vitro*.

6.2 Efecto de aislamientos de *Trichoderma* endófito en el control de *Verticillium dahliae* L., patógeno de *Thebroma cacao* a nivel de invernadero.

En la fase a nivel de invernadero se evaluó la incidencia y la severidad de la enfermedad muerte súbita, causada por *Verticillium dahliae*, y en ambas variables también se determinó el Area Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad (AUDPC). El cuadro 8 muestra análisis de varianza del porcentaje de incidencia de la muerte súbita causada por *Verticillium dahliae*, en plantas de cacao de tres meses de edad, colonizadas con aislamientos de *Trichoderma* endófito, 18 días después de la inoculación (DDI) del patógeno, donde se observa que existen diferencia significativas ($p=0,01$) entre los tratamientos y con un coeficiente de variabilidad de 22,41. Siendo los tratamientos inoculados con *Trichoderma* quienes presentaron menor porcentaje de incidencia con valores comprendidos entre 20 y 90%, a comparación del tratamiento Control que presento 100% de incidencia. Además el cuadro 7 muestra el porcentaje de incidencia y el área bajo la curva del progreso de la enfermedad (AUDCP) de la muerte súbita causada por *Verticillium dahliae* en plantas de cacao colonizadas con aislamientos de *Trichoderma* endófito. Siendo, el aislamiento TE-54 el más significativo en la reducción de la enfermedad, quien presentó el valor más bajo de incidencia (20%), seguido de los aislamiento TE-3 y TE-7 con 50 y 40% de incidencia respectivamente, presentando diferencias significativas entre ellos. Sin embargo, los aislamientos TE-84, TE-87, TE-91, TE-97 y TE-108 fueron los que mayor incidencia mostraron con valores de 80 y 90% de incidencia. Así mismo, la figura 17 y 18 muestra el AUDPC del

porcentaje de incidencia de la muerte súbita, donde todos los aislamientos de *Trichoderma* endófito mostraron menor AUDPC que el tratamiento Control. Los aislamientos que presentaron los valores más bajos de AUDPC fueron TE-54, TE-3 y TE-7 con valores de 130, 260 y 270 respectivamente cuyos valores de incidencia no superaron el 50%. Asimismo, los resultados de las evaluaciones del experimento a nivel de invernadero, también muestran que los síntomas de marchitez, amarillamiento foliar, necrosamiento y defoliación causado por *Verticillium dahliae* fueron observados en todos los tratamientos inoculados con el patógeno, pero no fueron observados en el tratamiento inoculado con agua destilada estéril (Control II). Las plantas que crecieron a partir de semillas inoculadas con aislamientos de *Trichoderma* endófito, mostraron menores valores de severidad de la muerte súbita causada por *Verticillium dahliae*, 18 días después de la inoculación del patógeno, a comparación de las plantas obtenidas de semillas libres de *Trichoderma* y donde solo se inóculo al patógeno (Control I).

El cuadro 10 muestra análisis de varianza del porcentaje de severidad (%SV) de la muerte súbita causada por *Verticillium dahliae*, en plantas de cacao colonizadas con aislamientos de *Trichoderma* endófito, 18 DDI, donde se observa que existen diferencia significativas ($p=0,01$) entre los tratamientos. Siendo tratamientos inoculados con *Trichoderma* quienes presentaron menor grado de severidad, con valores comprendidos entre 0,70 y 2,28 a comparación del tratamiento Control con 3,06 (Cuadro 9).

Estos resultados indican que los tratamientos inoculados con *Trichoderma* endófito en semillas, ofrecieron alguna reducción en el avance de los síntomas de la enfermedad en plantas de cacao de tres meses de edad. De este modo el aislamiento TE-54, fue el que mostró mayor reducción del progreso de la enfermedad obteniendo valores de 20 % de incidencia y 13,06 % de severidad después de 18 días de la inoculación de *Verticillium dahliae*, seguido de los aislamientos TE-3 y TE-7 que tuvieron valores de incidencia de 50 y 40 % respectivamente, valores de severidad de 23,92 y 22,79% respectivamente. Similares resultados fueron reportados por Hanson (2000), donde menciona que el uso de dos cepas de *Trichoderma virens* (G4 y G-6) demostraron reducir la severidad de la enfermedad de marchitamiento causada por *Verticillium dahliae* en plantas algodón cultivar Rowden, al 18 % para el G-4 y al 16 % para G-6. Esto probablemente se deba a la capacidad de *Trichoderma* además ser antagonista a ciertos patógenos, también puede inducir resistencia en plantas, activando genes que están relacionados con brindar resistencia patogénica en las plantas. Como menciona, Yedidia *et al.*, (2001) demostrando que la inoculación *T. harzianum* (T-203) en raíces de pepino, inducía resistencia en la planta, al encontrar que las plantas tratadas con un producto químico inductor de resistencia (ácido 2,6-dicloroisonicotínico) mostraban respuestas similares en defensa, con las plantas inoculadas con el agente de biocontrol. En otros estudios relacionas a *Trichoderma* y *Verticillium dahliae*, Jabnoun *et al.*, (2009), encontró que cepas de *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma virens* y *Trichoderma viride*, redujeron la severidad de la enfermedad causada por *V. dahliae* en más del 60 %, en plantas de tomate cv Ventura, a los 60 días

después del trasplante. Jiménez *et al.*, (2009) menciona también que el producto Biotec a base de dos especies; *T. asperellus* y *T. gamsii* redujeron en un 60% el desarrollo de Verticilosis causada por *Verticillium dahliae* en plántones de olivo.

El progreso de la enfermedad del porcentaje de incidencia se puede observar la figura 17 y en el anexo 1, donde en el aislamiento TE-54, la incidencia de la enfermedad no se incrementó desde los 12 días después de la inoculación (DDI) del patógeno (Aparición de los primeros síntomas) hasta los 18 DDI (Término del experimento). Sin embargo, los aislamientos TE-3 y TE-7 con valores de AUDPC 260 y 270 respectivamente, no fueron proporcionales al porcentaje de incidencia. Así mismo, en el anexo 1 se puede observar que el inicio de la enfermedad (8 DDI) del TE-3 fue bajo (10% incidencia) y con un avance lento hasta los 12 DDI, incrementándose la incidencia al 40% a los 14 DDI, manteniéndose así hasta los 17 DDI y al término del experimento alcanzó el 50% de incidencia, mientras que, en el aislamiento TE-7 el inicio del desarrollo de la enfermedad fue tardía (11 DDI) con 30% de incidencia y el avance fue rápido, alcanzando a los 14 DDI el 40% de incidencia hasta el final del experimento. Por otra parte TE-91 y TE-97 mostraron alta incidencia (90%), cuyos valores de AUDPC fueron 365 y 445 respectivamente; el mayor AUDPC del TE-97, se debió a la temprana aparición de la enfermedad (7 DDI) y el incremento progresivo de la incidencia; iniciando el desarrollo de la enfermedad con 10% hasta los 10 DDI, con un incremento de 40 y 50 % a los 11 y 12 DDI respectivamente, alcanzando finalmente el 90 % a los 16 DDI. Sin embargo, el

inicio de la enfermedad con TE-91 fue a los 12 DDI con 20% de incidencia, a los 14 DDI presento un incremento rápido llegando al 60 %, y 90% en el último día de evaluación (18 DDI). Así mismo, TE-84, TE-87 y TE-108 presentaron 80 % de incidencia, pero diferentes valores de AUDPC con 420, 400 y 370 respectivamente. TE-84 resulto con mayor AUDPC, debido a que el inicio del progreso de la enfermedad fue temprana (9 DDI) con 10% de incidencia, teniendo un incremento progresivo de 40, 50 y 80% de incidencia, a los 12, 14 y 16 DDI respectivamente. Mientras que TE-87 tuvo un inicio de la enfermedad tardío a los 12 DDI con 40 %, incrementando al 60 y 80 % a los 14 y 16 DDI respectivamente, en cambio TE-108 tuvo bajo inicio del desarrollo de la enfermedad, con 10 % de incidencia a los 11 DDI, incrementando luego al 30, 60, 70, y 80% de incidencia de la enfermedad a los 12, 14, 16 y 18 DDI respectivamente.

En la figura 19 muestra la relación del porcentaje de severidad de la enfermedad y el AUDPC, en donde todos los tratamientos inoculadas con *Trichoderma* presentaron valores menores, comprendidos entre 13,06 y 44,31% de severidad, y valores de AUDPC entre 54,32 y 141,13 a comparación del tratamiento Control que obtuvo 59,82% de severidad y 226,72 de AUDPC. Así mismo, en la figura 20 y el anexo 2, se observa el AUDPC del porcentaje de severidad de la muerte súbita, a los 12, 14, 16, y 18 DDI de *Verticillium dahliae*, en plantas de cacao de tres meses de edad, colonizadas con aislamientos de *Trichoderma* endófito. Donde el aislamiento TE-54 con 13,06% de severidad fue el que obtuvo el menor valor de AUDPC (54,32), siendo el

más efectivo en la reducción de la enfermedad hasta 18 DDI, se observa que en este aislamiento el progreso de la severidad de la enfermedad fue lento, con 1,71; 9,37; 10,41 y 13,06% a los 12, 14, 16 y 18 DDI respectivamente, resultando tener un bajo AUDPC. Así mismo, los aislamientos TE-3, TE-7, TE-91 y TE-108, con porcentaje de severidad de 23,92; 22,79; 29,76 y 27,91% respectivamente, obtuvieron valores de AUDPC entre 66,48 y 100,14, siendo TE-7 con menor porcentaje de severidad, pero presentó mayor AUDPC (100,14), esto se debe a que el progreso de la severidad de la enfermedad se dio de manera más agresiva, iniciando con 8,09% de severidad a los 12 DDI, incrementándose rápidamente al 16,43% a los 14 DDI, posteriormente alcanzando el 18,2 y 22,79% a los 16 y 18 DDI respectivamente. Mientras que en TE-3 con 66,48 fue el que obtuvo menor AUDPC de todos los aislamientos antes mencionados, debido a que el progreso de la severidad fue lenta iniciando con 2,99 % a los 12 DDI, incrementándose al 6,93 % a los 14 DDI, seguido de un 12,85% en los dos siguientes días y finalmente superando al TE-7, alcanzando el 23,92% de severidad a los 18 DDI. Por otro lado TE-84, TE-87 y TE-97 con valores de 37,04; 44,31 y 38,05% de severidad respectivamente, fueron los aislamientos de *Trichoderma* que presentaron mayor AUDPC, alcanzando hasta los 18 DDI, valores de 111,87; 128,87 y 147,13 respectivamente; así mismo, se observa que estos aislamientos mencionados casi tuvieron la misma tendencia de la curva del progreso de la enfermedad, siendo TE-97 quien presentó mayor AUDPC, debido a la temprana aparición de la enfermedad, con 10% a los 7 DDI (anexo 2) y con 8,97% de severidad a los 12 DDI, incrementando al 16,58% a los 14 DDI, para luego incrementar

rápidamente al 30,48% de severidad a los 16 DDI y finalmente alcanzar el 38,05% a los 18 DDI.

En cuanto a las evaluaciones realizadas con respecto al desarrollo de planta, el cuadro 14, muestra el análisis de varianza del crecimiento de las plantas de cacao, colonizadas con aislamientos de *Trichoderma* endófito, después de 18 DDI del patógeno, a un nivel de significancia de 0,01 y con un coeficiente de variabilidad de 3,68, indicando que no existió diferencias significativas entre tratamientos. Así mismo en el cuadro 13 y la figura 22 se puede observar que todos los tratamientos evaluados se comportaron estadísticamente iguales; pero que si hubo diferencias numericas entre tratamientos, según la prueba de rango multiple Duncan ($p=0,01$). Donde los valores mas altos en altura de planta, generaron los aislamientos TE-87 y TE-54 con 34,19 y 34,15 centímetros respectivamente, seguido de los aislamientos TE-84 y TE-3 con valores de 33,74 y 33,10 centímetros respectivamente. Así mismo, los asilamientos TE-97, TE-7 y TE-91 generando crecimiento en planta con 32,98; 32,84 y 32,82 centímetros respectivamente. Mientras que, el aislamiento TE-108 fue el que género menor altura de planta, con 31,12 centímetros, siendo superado por los controles; control I y control II con 32,38 y 31,6 centímetros respectivamente. Estos resultados son corroborados por (Yedidia *et al.*, 2003), en estudios de resistencia sistémica adquirida a fitopatógenos en respuesta a la interacción *planta-Trichoderma*, revelaron la acumulación de m-RNAs, asociados a genes de defensa involucrados en la producción y acumulación de fitoalexinas, habiéndose demostrado que este mecanismo no está relacionado

con la estimulación de crecimiento. Pese a todos los estudios disponibles, la naturaleza genética y molecular de estos efectos no ha sido explicada (Harman *et al.*, 2004). Así mismo Hanson (2000), menciona que la inoculación de *Verticillium dahliae* condujo a una reducción en la altura de plantas de algodón, en todos los tratamientos con *Trichoderma* en semillas, en dos cultivares Rowden y Deltapine 50, donde las cepas G-4 y G-6 (*Trichoderma virens*) no tuvieron efecto significativo en la altura de planta, en el cultivar Rowden, inoculado con *V. dahliae*. El mismo autor menciona que la cepa G-4 si tuvo efecto significativo en la altura en el cultivar Deltapine 50 inoculada con el patógeno. Semejante trabajo realizó Jabnoun *et al.*, (2009) encontrando que cepas de *T. harzianum*, *T. virens* y *T. viride* no tuvieron resultados significativos en la altura de plantas en tomate cv Ventura, a los 60 días después del trasplante, en un sustrato infestado con *Verticillium dahliae*, resultando ser estadísticamente iguales a los tratamientos sin *Trichoderma* y sin *V. dahliae*; y con *V. dahliae* y sin *Trichoderma*.

Los resultados muestran también en el cuadro 12, el análisis de varianza de la longitud de raíz de plantas de cacao de tres meses de edad colonizadas con aislamientos de *Trichoderma* endófito, a los 18 DDI de *Verticillium dahliae*, indicando que existe diferencia significativa entre tratamientos con un nivel de significancia de $p=0.01$ y con un coeficiente de variabilidad de 5,88. Así mismo, en el cuadro 11 y en la figura 21 muestra las diferencias significativas entre los tratamientos según la prueba de rango múltiple Duncan, donde se observa que el aislamiento TE-84 fue el único que presento mayor valor de longitud de raíz,

llegando a 1074,79 centímetros, pero no presento diferencias significativas con los Controles (Control I con 1057,16 cm y Control II con 1049,99 cm) y los aislamientos TE-91 y TE-97 con 1046,2 y 1010,20 centímetros respectivamente. Así mismo, los aislamientos TE-87 y TE-54 con 983,29 y 939,97 centímetros no mostraron diferencias significativas y resultaron ser superior a TE-3, quien tuvo 910,99 centímetro. Mientras que el aislamiento TE-7 con 788,28 centímetros de longitud de raíz, resulto ser superior y estadísticamente diferente a TE-108 con 731,64 centímetros y fue el tratamiento con el valor más bajo de longitud radicular. Estos resultados son similares a los obtenidos por otros autores, donde mencionan que *Trichoderma* tuvo efecto en el incremento del sistema radicular después de su aplicación, en distintos cultivos (Harman, 2000; Kleifeld y Chet, 1992).

El cuadro 16 muestra el análisis de varianza del peso seco aéreo (PS-A) y peso seco de raíz (PS-R) de plantas de cacao, colonizadas con aislamientos de *Trichoderma* endófito, 18 DDI de *Verticillium dahliae*, donde indica que existió diferencias significativas entre tratamientos, para ambas variables, al $p=0,01$ de significancia, con 3,84 y 5,56 de coeficiente de variabilidad para PS-A y PS-R respectivamente. Así mismo, en el cuadro 15 y figura 23 se observa que en ambas variables de evaluación el tratamiento Control II con 4,54 y 1,31 gramos para PS-A y PS-R respectivamente, se diferencia claramente de los demás tratamientos, siendo el que genero mayor peso de biomasa seca, en comparación con los demás tratamientos, seguido de los aislamientos TE-3 y TE-91 con 3,99 y 3,83 gramos respectivamente y estadísticamente iguales,

fueron los aislamientos que generaron mayor PS-A a comparación de los demás aislamientos. Del mismo modo, los aislamientos que generaron mayor PS-R fueron TE-3, TE-54 y TE-97 con valores de 1,18; 1,21 y 1,16 gramos respectivamente, también comportándose estadísticamente iguales. Mientras que, los aislamiento TE-7, TE-54, TE-84, TE-87, TE-97, TE-108 y el tratamiento CONTROL I, con valores de 3,17; 3,60; 3,49; 3,67; 3,40; 3,72 y 3,71 gramos respectivamente, no presentaron diferencias significativas, y al mismo tiempo fueron los tratamientos que generaron menor PS-A. Por otra parte, los aislamientos TE-84, TE-91, TE-108 y el CONTROL I con valores de 0,89; 0,99; 0,93 y 1,03 gramos respectivamente, superaron estadísticamente en PS-R a los aislamientos TE-7 y TE- 87 con 0.80 y 0.84 gramos respectivamente. Jabnoun *et al.*, (2009), encontraron semejantes resultados, en plantas de tomate cv Ventura, obtenidas a partir de semillas de tratadas con especies de *Trichoderma*, a los 90 días después del transplante in un suelo infestado con *Verticillium dahliae*; obtuvieron incremento del peso de la biomasa aérea en más del 50 % comparadas con el tratamiento control infestado. Mientras que para el PS-R los aislamientos que generaron mayor biomasa fueron TE-54, TE-3 y TE-97 con valores de 1,21; 1,16 y 1,18 gramos respectivamente. Estos resultados coinciden con los señalados por Donoso *et al.*, (2008), Yedidia *et al.*, (2001) y Windham *et al.*, (1986) quienes mencionan que la aplicación de *T. harzianum* en semillero o en el transplante, incremento en el desarrollo de la planta y el sistema radical, debido a la producción de factores que pueden estimular el crecimiento y aumentar la capacidad de las raíces en aprovechar los nutrientes. Adicionalmente, este mejoramiento en el desarrollo de la planta

y las raíces puede favorecer el control de hongos que pueden causar enfermedades (Donoso *et al.*, 2008; Torres *et al.*, 2008; Benítez *et al.*, 2004; Lo *et al.*, 1997).

VII. CONCLUSIONES

- 7.1** En la prueba de antibiosis los aislamientos que completamente inhibieron el crecimiento micelial de *V. dahliae* fueron los aislamientos TE-83, TE-84 y TE-91, seguido de TE-7, y TE-20 con 61,21% y 60,49% de inhibición micelial de *V. dahliae*; mientras que los aislamientos TE-74 y TE-39 no obtuvieron efecto en el control de *V. dahliae*.
- 7.2** En la prueba de micoparasitismo los aislamientos que completamente colonizaron cultivos de *Verticillium dahliae* fueron TE-7, TE-20, TE-54, TE-56, TE-, TE-84, TE-91, TE-87, TE-102, TE-108, TE-116, seguido de TE-6 con 63,33% de colonización.
- 7.3** En la prueba de biocontrol en invernadero, el aislamiento TE-54 fue el que mayor redujo la enfermedad con valores promedios de 20 % de incidencia y 13,06 % de severidad; seguido de TE-3 y TE-7 con valores de incidencia de 50 y 40% respectivamente, y valores de severidad con 23,92 y 22,79% respectivamente; a comparación del tratamiento Control I que obtuvo valores de incidencia y severidad de 100 y 59,82 % respectivamente.
- 7.4** El aislamiento que genero mayor crecimiento radicular fue TE-84 con 1074,79, superando numéricamente al control I, Control II y a los demás aislamientos.

- 7.5** Todos los plantones de cacao donde se inóculo los aislamientos de *Trichoderma* y los controles, no mostraron diferencias significativas en cuanto a la altura de planta, comportándose estadísticamente iguales.
- 7.6** En cuanto a la biomasa, el aislamiento TE-3 y TE-91 fueron los que genero mayor biomasa aérea (PS-A) con valores de 3,99 y 3,83 gramos respectivamente, mientras que, TE-54, TE-97 y TE-3 fueron los aislamientos que generaron mayor biomasa seca radicular (PS-R) con 1,21; 1,16 y 1,18 gramos respectivamente, a comparación de los demás aislamientos y el Control I que obtuvo en PS-A y PS-R valores promedios de 3,71 y 1,03 gramos respectivamente.

VIII. RECOMENDACIONES

- 8.1 Identificar los metabolitos secundarios de los aislamientos de *Trichoderma* endófito que está inhibiendo el crecimiento micelial de *Verticillium dahliae*.
- 8.2 Evaluar la eficiencia de caldos de cultivo en la obtención de metabolitos secundarios antifúngicos de los mejores tratamientos (TE-54, TE-3 y TE-7) para el control de *Verticillium dahliae*.
- 8.3 Evaluar el control de *Verticillium dahliae* con los mejores tratamientos (TE-54, TE-3 y TE-7) en diferentes genotipos de cacao.
- 8.4 Evaluar la respuesta de las plantas colonizadas con aislamientos de *Trichoderma* endófito en campo infestado con *Verticillium dahliae*.
- 8.5 Realizar pruebas de control de la muerte súbita con los mejores tratamientos (TE-54, TE-3 y TE-7) en condiciones de campo.
- 8.6 Determinar el porcentaje de infección de *Verticillium dahliae* en plantas de cacao colonizadas con *Trichoderma* endófito.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Ahmad, J. S. y Baker, R. 1987.** Competitive saprophytic ability and cellulolytic activity of rhizosphere competent mutant of *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology*, 77: 358-362.
2. **Almeida, H. A.; Almeida, L. C. C.; Lima, A. A. 1993.** Effect of water restriction on the appearance of the cacao *Verticillium* wilt. In: *Annals of the Brazilian Agro-meteorology Conference* 8: 187.
3. **Altomare, C.; Norvell, W. A.; Bjorkman, T.; Harman, G. E. 1999.** Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* 1295-22. *Appl Environ Microbiol* 65: 2926-2933.
4. **APPCACAO (Asociación Peruana De Productores De Cacao). 2009** Consultado el 01 junio, 2010. Disponible en http://appcacao.org/index.php?option=com_content&task=view&id=431&Itemid=39/:
5. **Arevalo, E.; Zuñiga, L.; Arevalo, C.; Adriazola; J. 2004.** Cacao: Manejo integrado del cultivo y transferencia de tecnología en la Amazonia peruana. Instituto de cultivos tropicales-ICT. Peru. 184 p.
6. **Arnold, A. E. y Herre, E. A. 2003.** Canopy cover and leaf age affect colonization by tropical fungal endophytes: Ecological pattern and process in *Theobroma cacao* (Malvaceae). *Mycologia*. 95(3): 388-398.
7. **Bacon, C. W. y Hinton, D. M. 1997.** Isolation and culture of endophytic bacteria and fungi. En: Hurts CJ, Knudsen GR, McInerney MJ,

Stetzenbach LD, Walter MV (Eds.) Manual of Environmental Microbiology. Washington, ASM Press, 1997: 413-425.

8. **Bailey, B. A.; Bae, H.; Strem, M. D.; Crozier, J.; Thomas, S. E.; Samuels, G. J.; Vinyard, B. T.; Holmes, K. A. 2008.** Antibiosis, mycoparasitism, and colonization success for endophytic *Trichoderma* isolates with biological control potential in *Theobroma cacao*. Article in Press. Biological Control.
9. **Bailey, B. A.; Korcak, R. F.; Anderson, J. D. 1993.** Sensitivity to an ethylene biosynthesis inducing endoxylanase in *Nicotiana tabacum*-L cv xanthi is controlled by a single dominant gene. *Plant Physiol* 101: 1081-88.
10. **Baker, R. y Griffin, G. J., 1995.** Molecular strategies for biological control of fungal plant pathogens. Novel approaches to integrated pest management. En: R. Reuveni (Ed.). Boca Raton, Florida: CRC Press. 153-182.
11. **Beagle, J. and G. Papavizas, 1985.** Survival and proliferation of Propagules of *Trichoderma* spp. And *Gliocladium virens* in soil and plant rhizospheres. *Phytopathology* 75: 729-732.
12. **Benhamou, N. y Chet, I. 1996.** Parasitism of sclerotia of *Sclerotinium rolfsii* by *Trichoderma harzianum*: ultraestructural and cytochemical aspects of the mycoparasitic process. *Phytopathology* 83: 1062-1071.
13. **Benhamou, N. y Chet, I. 1997.** Cellular and molecular mechanisms involved in the interaction between *Trichoderma harzianum* and *Pythium ultimum*. *App. Environ. Microbol.* 63: 2095-2099.

14. Benitez, T.; Rincon, A. M.; Limon, M. C.; Codon, A. 2004. Biocontrol mechanism of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*. 7: 249-260.
15. Berg, G.; Knaape, C.; Ballin, G.; Seidel, D. 1994. Biological control of *Verticillium dahliae* Kleb. by natural occurring rhizosphere bacteria. *Arch. Phytopath. Pflanza*. 29: 249-262.
16. Berlanger, I. y Powelson, M. L. 2000. Verticillium wilt. The Plant Health Instructor. DOI: 10.1094/PHI-I-PHI-I-2000-0801-01. Updated 2005. The American Phytopathological Society, 2012.
17. Blanco, L. M.; Jiménez, D. R.; Caballero, J. M. 1984. Symptomatology, incidence and distribution of Verticillium wilt of olive trees in Andalucía. *Phytopathologia Mediterranea* 23: 1-8.
18. Blanco, L. M. y Jiménez, D. R. 1995. Una propuesta De Lucha Integrada Contra La Verticilosis Del Olivo. *Fruticultura Profesional*, 70: 52-59.
19. Bowers, J. H.; Bailey, B. A.; Hebbar, P. K.; Sanogo, S.; Lumsden, R. D. 2001. The impact of plant disease on world chocolate production. *Plant Health Progress* 10.1094/PHP-2001-0709-01-RV (online).
20. Brandeau, J. 1970. El cacao técnicas agrícolas y producciones tropicales. Barcelona, España, Blume. 282 p.
21. Bruce, A.; Srinivasan, U.; Staines, H.J.; Highley, T.L. 1995. Chitinase and laminarinase production in liquid cultura by *Trichoderma* spp., and their role in biocontrol of Wood decay fungi. *International Biodeterioration*. 337-353.

22. **Brunner, K.; Peterbauer, C. K.; Mach, R. L.; Lorito, M.; Zeilinger, S.; Kubicek, C. P. 2003.** The Nacetylglucosaminidase of *Trichoderma atroviride* is essential for chitinase induction by chitin and of major relevance to biocontrol. *Curr Genet* 43: 289-295.
23. **Cardoza, R. E.; Hermosa, M. R.; Vizcaíno, J. A.; Sans, L.; Monte, E.; Gutiérrez, S. 2005.** Secondary metabolites produced by *Trichoderma* and their importance in the biocontrol process. En *Microorganism for industrial enzymes and biocontrol*. Mellado E. y Barredo J. L (eds). Reseachs Signpost, Kerala, India. pp.1-22
24. **Campbell, R. 1989.** Biological control of microbial plant pathogens. Cambridge University Press. Cambridge. 218p.
25. **Carroll, G. 1988.** Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. *Ecology* 1988; 69: 2-9.
26. **Chang, Y. C.; Chang, Y.; Baker, R.; Kleifeld, O.; Chet, I. 1986.** Increased growth of plants in the presence of the biological control agent *Trichoderma harzianum*. *Plant Disease*. 70: 145-148.
27. **Chet, I. y Henis, Y. 1985.** *Trichoderma* as a biocontrol agent against soil-borne root pathogens, In: *Ecology and Management of Soil-borne Plant Patogens*, ed. C.A. Parker, American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA, 110p.
28. **Chet, I.; Benhamou, N.; Haran, S. 1998.** Mycoparasitism and lytic enzymes. En *Trichoderma and Gliocladium* (vol.2). Kubicek, C. P . y Harman, G. E. (eds). Taylor and Francis, Londres, Reino Unido, pp.153-172.

29. **CNCH (Compañía Nacional de Chocolates) 1988.** Manual para el Cultivo del Cacao. Colombia. 140 p.
30. **Conrath, U.; Pieterse, C. M.; Mauch-Mani, B. 2002.** Priming in plant pathogen interactions. *Trends Plant Sci* 7: 210-216.
31. **Contreras, C. H.; Macías, R.L.; Cortés, R. C. López, B. J. 2009.** *Trichoderma virens* a plant beneficial fungus enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin dependent mechanism in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 149: 1579-1592
32. **Cutler, H. G. y LeFiles. J. 1978.** Trichodermin: Effects on plants. *Plant Cell Physiol* 19: 177-182
33. **Cope, F.W. 1976.** Cacao. *Theobroma cacao* L. (Sterculiaceae). Evolution of crop Plants. London, UK and New York, US Longman, Ed. NW Simmonds. p. 285-289.
34. **Crozier J.; Thomas, S.; Aime, M.; Evans, H.; Holmes, K. 2006.** Molecular characterization of fungal endophytic morphospecies isolated from stems and pods of *Theobroma cacao*. *Plant Pathology*. 55: 783-791.
35. **Daoubi, M.; Pinedo, R. C.; Rubio, M. R.; Hermosa, M. R.; Monte, E.; Aleu, J.; Collado, I. G. 2009.** Hemisynthesis and absolute configuration of novel 6-pentyl-2H-pyran-2-one derivatives from *Trichoderma* spp. *Tetrahedron* 65: 4834-4840.
36. **Delgado, A. A. 1991.** Eficacia de fungicidas en el control de agallas de puntos verdes inducidas artificialmente en plántulas de cacao (en línea). Venezuela. *Revista agronómica (LUZ)* 8(1):29-47 Consultado 18 mar

2007. Disponible en <http://www.revfacagronluz.Org.ve/v08-10801z030.htm>.

37. Degenkolb, T.; Dieckmann, R.; Nielsen, K. F.; Gräfenhan, T.; Theis. Ch.; Zafari, D.; Chaverri, P.; Ismaiel, A.; Brückner, H.; Von Döhren, H.; Thrane, U.; Petrini, O.; Samuels, G. J. 2008. The *Trichoderma brevicompactum* clade: a separate lineage with new species, new peptaibiotics, and mycotoxins. *Mycol Progress* 7:177-219.
38. Deng, S.; Lorito, M.; Penttilä, M.; Harman, G. E. 2007. Overexpression of an endochitinase gene (ThEn-42) in *Trichoderma atroviride* for increased production of antifungal enzymes and enhanced antagonist action against pathogenic fungi. *Appl Biochem Biotechnol* 142: 81-94.
39. D'Ercole, N.; Nipoti, P.; Di Pillo, L.; Gavina, F. 2000. *In vitro* and *in vivo* test of *Trichoderma* spp., as a biocontrol agent of *Verticillium dahliae* Kleb. In eggplants. In: Tjamos E.C., Rowe, R.C., Heale, J.B., Fravel, D.R (Eds). *Advances in Verticillium: Research and Disease Management*, APS Press, St. Paul, M.N., USA, pp 260-263.
40. Distefano, G.; La Malfa, S.; Vitale, A.; Lorito, M.; Deng, Z.; Gentile, A. 2008. Defence-related gene expression in transgenic lemon plants producing an antimicrobial *Trichoderma harzianum* endochitinase during fungal infection. *Transgenic Res* 17: 873-879.
41. Díaz, J. 1994. Algunos aspectos biológicos de *Trichoderma* y su posible uso como biocontrol. Trabajo de Diploma en opción al título de Ingeniero Agrónomo. Universidad Agraria de La Habana.

42. Donoso, E.; Lobos, G.; Rojas, N.; 2008. Efecto de *Trichoderma harzianum* y compost sobre el crecimiento de plántulas de *Pinus radiata* en vivero. Bosque 29 (81):52-57. Disponible en: <http://www.scielo.cl/pdf/bosque/v29n1/art06.pdf>
43. Elad, Y. y Kapat, A. 1999. The role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea*. European Journal of Plant Pathology, 105. 177-189.
44. Elad, Y.; Barak, R.; Chet, I. 1984. Parasitism of esclerotia of *Sclerotinium rolfsii* by *Trichoderma harzianum*. Can J Microbiol 28: 719-7125.
45. Enríquez, G. A.; Salazar, C. 1987. Manual del Cacao para agricultores. 1ra Edición San José CR.EUNED. Coedición: CATIE-ACRI-UNED. 150p.
46. Fernández, L. O. 2001. Microorganismos Antagonistas Para El Control Fitosanitario. Manejo Integrado de Plagas. 62: 96-100.
47. Fradin E. F. y Thomma, B. H. J. 2006. Physiology and molecular aspects of Verticillium wilt diseases caused by *V. dahliae* and *V. albo-atrum*. Molecular Plant Pathology 7: 71-86.
48. Fravel, D. R.; Davis, J. R.; Sorensen, L. H. 1986. Effect of *Taloromyces flavus* and methan on Verticillium wilt incidence and potato yeild 1984-1985. En-. J.R. Hartman (Ed.), Biological and Cultural Tets for Control of Plant Diseases. Vol. 1 (p 17) APS Press, St Paul, MN, 84 pp.
49. French, E. R. y Herbert, T. T. 1982. Métodos de Investigación fitopatológica. 1ª ed., 1ª reimpresión Editorial Texto Ltda. – San José, Costa Rica: IICA (Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura). Pp 125, 126.

50. **FUNDACITE (Fundación para la ciencia y la Tecnología). 1998.** Plan para el manejo del cacao. FUNDACITE-ARAGUA. Maracay, Estado Aragua, VE.
51. **Galeas, M. A.; Olivera, R de.; Ferrazo, D.; Borghi, F.; Spaggiari, C.A.; Patrocínio, E. 2010.** Inducción de la resistencia al *Verticillium dahliae* Kleb. En *Theobroma cacao* L. mediante el uso de la Turfa liquida en diferentes concentraciones. 15° Conferencia Internacional Sobre Investigaciones Del Cacao. Linhares-Espírito Santo, Brasil. Presentación Con Carteles Agronomía .165 p.
52. **Garrett, S. D. 1965.** Ecology of soil-borne plant pathogens. Prelude to biological control. En: Baker, K. F. and Snyder, W. C (Eds). Toward biological control of soil-borne plant pathogens (pp. 4-17). Caligornia: University California Press.
53. **Glienke, B. C.; Aguilar, V. C.; Carneiro, M.; Vianna, P.; Azevedo, J. 2002.** Genetic variability in the endophytic fungus *Guignardia citricarpa* isolates from citrus plant. Genetic and Molecular Biology. 25 (2): 251-255.
54. **Goldman, G. H.; Hayes, C.; Harman, G. E. 1994.** Molecular and cellular biology of biocontrol by *Trichoderma* spp. Blotech. Tibtech. 12: 478-482.
55. **Handelsman, J. and Parke, J. L. 1989.** Plant microbe interactions. En: Kosuge, T., y Nester, E.W. (Ed.). Mechanism in biocontrol of soilborne plant pathogens. 27-61. New York: McGraw-Hill.

56. **Hanson, L. E. 2000.** Reduction of *Verticillium* Wilt Symptoms in Cotton Following Seed Treatment with *Trichoderma virens*. *Plant Pathology & Nematology. The Journal of Cotton Science* 4: 224-231.
57. **Hardy, F. 1961.** Manual de Cacao. Edición en español. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Turrialba, Costa Rica. 380p.
58. **Harman, G. E. 2006.** Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 96: 190-194.
59. **Harman, G. E.; Howell, C. R.; Viterbo, A.; Chet, I.; Lorito, M. 2004.** *Trichoderma* species opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat Rev Microbiol* 2: 43-56.
60. **Henni, J. E. 1987.** Evaluation de l'efficacité de certains champignons antagonistes vis-à-vis de *Verticillium dahliae*. *Cryptogamie, Mycologie* 8, 203-207.
61. **Hernández, T.; Aranzazu, F.; Arévalo, E.; Ríos, R. 1990.** La moniliasis del cacao en el Perú. *Agrotropica* 2:56-58
62. **Herrera, P. 2011.** Cacao: Alimento de Inclusión Social. El peruano. Lima, Perú. Sep. 02. Disponible en <http://www.elperuano.pe/Edicion/noticia.aspx?key=Ji0eCkFr4cs>
Consultado 28 ene. 2012.
63. **Hjeljord, L. and Tronsmo, A. 1998.** *Trichoderma* and *Gliocladium* in biological control: an overview. In: *Trichoderma & Gliocladium: Enzymes, biological control and commercial applications*. Harman GE, Kubice CP. (Eds). Volumen 2. p. 131-151. Taylor & Francis.

64. **Howell, C. R. 2003.** Mechanisms Employed by *Trichoderma* Species in the biological Control of Plant Diseases: The History and Evolution of Current Concepts. *Plant Disease* / Vol. 87 No. 1.
65. **Howell, C. R.; Hanson, L. E.; Stipanovic, R. D.; Puckhaber, L. S. 2000.** Induction of terpenoid synthesis in cotton roots and control of *Rhizoctonia solani* by seed treatment with *Trichoderma virens*. *Phytopathology* 90: 248-252.
66. **Howell, C. R. 2006.** Understanding the mechanisms employed by *Trichoderma virens* to effect biological control of cotton diseases. *Phytopathology* 96: 178-180.
67. **Hoyos, L.; Chaparro, P.; Abramsky, M.; Chet I.; Orduz, S. 2008.** Evaluación de aislamientos de *Trichoderma* spp. contra *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii* bajo condiciones *in vitro* y de invernadero. *Revista Agronomía Colombiana*. En edición.
68. **Hunsley, D. and Burnett, J. H. 1970.** The structural architecture of the walls of some hyphal fungi. *J. Gen. Microbiol.* 63: 75-94.
69. **ICCO (The International Cocoa Organization). 2003.** boletín trimestral de la estadística del cacao. Volumen 2, N° 2.
70. **ICCO (The International Cocoa Organization). 2005.** Boletín trimestral de estadística del cacao. Volumen XXXI, N° 3 Año cacaotero. 2004-05.
71. **Inbar, J.; Abramsky, M.; Cohen, D.; Chet, I. 1994.** Plant growth enhancement and disease control by *Trichoderma harzianum* in vegetable seedlings grown under commercial conditions. *European Journal of Plant Pathology*. 100: 337-346.

72. Inbar, J. y Chet, I. 1996. The role of lectins in recognition and adhesion of the mycoparasitic fungus *Trichoderma* spp. To its host. *Adv Exp Med Biol* 408, 229-231.
73. Inbar, J. y Chet, I. 1997. Lectins and biocontrol. *Critical Reviews in Biotechnology*, 17. 1-20.
74. Jabnoun, H. K.; Daami, M. R.; Ayed, F.; El, M. M. 2009. Biological Control of Tomato Verticillium Wilt by Using Indigenous *Trichoderma* spp. The African of Plant Science and Biotechnology. Global Science Books.
75. Jackson, R .M. 1965. Antibiosis and fungistasis of soil microorganismos, p. 363-369. In. Baker K.F. and Snyder W.C. (ed.). *Ecology of soil-borne plant pathogens*. Universidad of California Press, Berkeley and Los Angeles.
76. Jakobs, D.; Geremia, R. A.; Goldman, G. H.; Kaomen, O.; Van Montagy, M.; Herrera, E. A. 1991. Study of the expression of b-(1-3) glucanase of *Trichoderma harzianum*. *Petria* 1: 125-126.
77. Jensen, D. F. y Wolffhechel, H. 1995. Biological control: Benefits and risks. (Series: Plant and microbial biotechnology research. En M.T.H., Heikki y J.M. Lynch (Eds.) *The use of fungi, particulary *Trichoderma* spp., and *Gliocladium* spp., to control root rot and damping off disease*. 177-189. Cambridge: Cambrige University Press.
78. Jiménez, D. R. y Montes, A. F. 1974. Notas sobre *Verticillium dahliae* Kleb, causante de marchitez en diversos huéspedes. *INIA Ser. Prot. veg.* 4: 11-18.

79. Johnston, M. 1997. *Theobroma cacao* (L.) in Guyana: germplasm history, status and potential utilization. Plant Genetic Resources Newsletter 122:28-35.
80. Jabnoun-Khiareddine, H.; Daami-Remadi, M.; Ayed, F.; Mahjoub, M El. 2009. Biology Control of Tomato Verticillium Wilt by Using Indigenous *Trichoderma* spp. *The African Journal of Plant Science and Biotechnology*. Global Science Books 2009. Tunisia. 26-36p.
81. Keszler, A.; Forgacs, E.; Kotai, L.; Vizcaíno, J. A.; Monte, E.; García, A. I. 2000. Separation and identification of volatile components in the fermentation broth of *Trichoderma atroviride* by solid phase extraction and gas chromatography mass spectrometry. J Chromatogr Sci 38: 421-424.
82. Kleifeld, O. y Chet, I. 1992. *Trichoderma harzianum*-interactions with plants and effect on growth response. Plant and Soil 144: 267-272.
83. Korolev, N.; Rav, D. D.; Elad, Y. 2008. The role of phytohormones in basal resistance and *Trichoderma* induced systemic resistance to *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis thaliana*. BioControl 53: 667-683.
84. Lamari, L. 2002. ASSESS, Image analisis software for plant disease quantification. The American Phytopathological Society. St. Paul. Mennesota. 119 p.
85. Lanuad, C.; Motamayor, J. C.; Resterucci, A.M. 2000. Implications of New Insight into the Genetic Structure of *Theobroma cacao* L. for Breeding Strategies. In Proceedings of the International Workshop on new

Technologies and Cocoa Breeding. Ingenic. Kota Kinabalu, Malaysia.
16-17 Octubre 2000. p 89-107.

86. **León, J. 2000.** Botánica de los cultivos tropicales. 3ed. San José, C.R. 522 p.
87. **Lorenzo, N. 2001.** Prospección de hongos antagonistas en la provincia de Cienfuegos. Efectividad y posibilidades de reproducción de las cepas nativas de *Trichoderma* spp. Tesis en opción al título de Master en Protección Vegetal Universidad Agraria de La Habana.
88. **Lorito, M.; Harman, G.; Prieto, A Di.; Hayes, C. 1990.** Extracellular chitinolytic enzymes produced by *T. harzianum*, purification, characterization and molecular cloning. *Phytopathol.* 82(10):10-77.
89. **Lorito, M.; Hayes, C. K.; Di Pietro, A.; Woo, S. L.; Harman, G. E. 1994.** Purification, characterization and synergistic activity of a glucan 1,3- β -glucosidase and an N-acetyl- β -glucosaminidase from *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology*84: 398-405.
90. **Lu, Z.; Tombolini, R.; Woo, S.; Zeilinger, S.; Lorito, M.; Jansson, J. K. 2004.** *In vivo* study of *Trichoderma* pathogen plant interactions, using constitutive and inducible green fluorescent protein reporter systems. *Appl Environ Microbiol* 70: 3073-3081.
91. **Martins-Corder, M.P.; Melo, I.S de. 1998.** Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* spp. A *Verticillium dahliae* Kleb. Piracicaba, SP- Brazil. *Scientia Agricola.* 55.
92. **Mejía, L. y Arguello, O. 2000.** Tecnología para el Mejoramiento de Sistemas de Producción de Cacao. Publicación CORPOICA Ministerio de

Agricultura. Ed. Impresiones Colombianos. Bucaramanga, CO. 2000. p. 144.

93. **Melgarejo, P. y Sagasta, E. 1989.** Influence of *Penicillium frequentans* and two of its antibiotics on production of stromata by *Monilinia laxa* in culture. Can. J. Bot. 67: 83-87.
94. **Melo, I. S. 1991.** Potencialidades de utilização de *Trichoderma* spp. no controle biológico de doenças de plantas. In: BETTIOL, W., org. Controle biológico de doenças de plantas. Jaguariúna: CNPDA/EMBRAPA, p.135-156.
95. **Michel-Aceves, A. C., O. R. Domínguez, R. L. Gutiérrez, M. E. Ochoa, J. C. Mesina, G. J. Samuels. 2001.** Especies de *Trichoderma* en suelos cultivados con mango afectados por "Escoba de Bruja" y su potencial inhibitorio sobre *Fusarium oxysporum* y *F. subglutinans*. Revista Mexicana de Fitopatología 19: 154-160.
96. **Migheli, Q.; Whipps, J. M.; Budge, S. P.; Lynch, J. M. 1995.** Production of inter- and intra-strain hybrids of *Trichoderma* spp. By protoplast fusion and evaluation of their biocontrol activity against soil-borne and foliar pathogens. J. Phytopathol. 143: 91-97.
97. **MINAG (Ministerio De Agricultura. Programa Para El Desarrollo De La Amazonia Proamazonia). 2004.** Manual Del Cultivo Del Cacao.
98. **Motamayor, J. 2001.** Etude de la diversité génétique et de la domestication des cacaoyers du groupe criollo (*Theobroma cacao* L.) à l'aide de marqueurs moléculaires. Le grade de Docteur en Sciences. Université Paris XI. 177 p.

99. **Montealegre, J. R. y Henriquez, J. 1990.** Posibilidades de control integrado de *Sclerotium rolfsii* Sacc. mediante hongos del género *Trichoderma* y fungicidas. *Fitopatología*, 25(2), 68-74.
100. **Nelson, E. B. 1991.** Handbook of Applied Mycology. Volumen 1: Soil and Plants. En Arora, D.k., Rai, B., Mukerji, K.G., Knudsen, G.R. (Eds). Current limits to biological control of fungal phytopathogens (pp. 327-355). New York: Marcel Dekker, Inc.
101. **Nielsen, K. F.; Grafenhan, T.; Zafari, D.; Thrane, U. 2005.** Trichothecene production by *Trichoderma brevicompactum*. *J. Agric Food Chem* 53: 8190-8196.
102. **Noronha, E. F. y Ulhoa, C. J. 1996.** Purification and characterization of an endo β -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum*. *Canadian Journal of Microbiology*, 42, 1039-1044.
103. **Pan, S. Q.; Ye, X. S.; Kuc, J. 1992.** Induction of chitinases in tobacco systemically protected against blue mold by *Peronospora tabacini* or Tobacco Mosaic Virus. *Pytopathology*, 82, 119-123.
104. **Papavizas, G. C. 1985.** Survival of *Trichoderma harzianum* in soil and in pea and potencial for biocontrol. *Annual Review of Phytopathology*, 23. 23-54.
105. **Patiño, V. M. 1958.** Historia del genero *Theobroma* en América equinoccial. In Conferencia Interamericana de Cacao, 7ª. Palmira, colombia. Trabajos presentados. S.n.t. doc. 82, 63 p. (Mecanografiado).
106. **Pérez, N. 2004.** Manejo Ecológico de plagas. CEDAR: La Habana, Cuba. 296 pp.

107. Punja, Z. K. y Zhang, Y. 1993. Plant chitinases and their roles in resistance to fungal diseases. *J. Nematology* 25: 526-540.
108. PROAMAZONÍA, 2004. Manual del cultivo de cacao. Progreso para el desarrollo de la Amazonia. Ministerio de Agricultura. Peru. 83 p.
109. Rafai, I. M El; Asswah, S. M. W.; Awdalla, O. A. 2003. Biocontrol of some tomato diseasee using some antagonistic microorganisms. *Pakistan Journal of Biological Science* 6, 399-406.
110. Reino, J. L.; Guerrero, R. F.; Hernández, G. R.; Collado, I. G. 2008. Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. *Phytochem Rev* 7: 89-123
111. Reithner, B.; Brunner, K.; Schuhmacher, R.; Peissl, I.; Seidl, V.; Krska, R.; Zeilinger, S. 2005. The G protein α subunit Tga1 of *Trichoderma atroviride* is involved in chitinase formation and differential production of antifungal metabolites. *Fungal Genet Biol* 42: 749-760.
112. Rivas, M.; Pavone, D. 2010. Diversidad de *Trichoderma* spp. en plantaciones de *Theobroma cacao* L. del estado Carabobo, Venezuela, y su capacidad biocontroladora sobre *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer. *Interciencia*. VOL. 35 N° 10.
113. Rocha, R. V.; Omero, C.; Chet, I.; Horwitz, B. A.; Herrera, E. A. 2002. *Trichoderma atroviride* G-protein α -subunit gene tga1 is involved in mycoparasitic coiling and conidiation. *Eukaryot Cell* 1: 594-605.
114. Rumbos, R.; Ramos, G.; Gómez, A. 2005. La muerte regresiva en plantas de cacao (en línea). Venezuela, CENIAP, INIA. Disponible en:

http://www.ceniap.gov.ve/pbd/RevistasTecnicas/inia_divulga/unmero%206/rumbos_r.pdf.

115. **Salgado, S. C. 2005.** Hongos endófitos en *Rosa hybrida*: Aislamiento, identificación y evaluación *in vitro* de la capacidad antagónica contra hongos fitopatógenos. Departamento de Biología, Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia
116. **Samuels, G. J. 1996.** *Trichoderma*: a review of biology and systematic of the genus. *Mycol Res.*; 100(8):923- 935.
117. **Sánchez, P. A. and Dubón, A. 1994.** Establecimiento y Manejo de cacao con Sombra. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, CATIE, Turrialba, CR. (Serie Técnica. Manual Técnico no 10. 82 p.).
118. **Santamarina, M. P.; Sanz, I.; Roselló, J.; Vañó, J. 2006.** Detección y aislamiento de metabolitos del hongo *Trichoderma harzianum* Rifai con actividad bactericida y funguicida. *Phytoma España* 122: 55-58.
119. **Santamarina, M. P.; Sanz, I.; Roselló, J.; García Breijo, F. J. 2006.** Una cepa de *Trichoderma harzianum* con un fuerte potencial para inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos y hongos productores de micotoxinas. Resúmenes del XVIII Congreso de la Sociedad Española de Microbiología.
120. **Schickler, H. y Chet, I. 1997.** Heterologous chitinase gene expresión to improve plant defense against phytopathogenic fungi. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 19. 196-201.
121. **Schirmböck, M.; Lorito, M.; Wang, Y. L.; Hayes, C. K.; Arisan, A. I.; Scala, F.; Harman, G. E.; Kubicek, C. P. 1994.** Parallel formation and

synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi. *Appl Environ Microbiol* 60: 4364-4370.

122. Segarra, G.; Van der, E. S.; Trillas, I.; Pieterse, C. M. 2009. MYB72, a node of convergence in induced systemic resistance triggered by a fungal and a bacterial beneficial microbe. *Plant Biol* 11: 90-96.
123. Shores, M.; Yedidia, I.; Chet, I. 2005. Involvement of jasmonic acid/ethylene signaling pathway in the systemic resistance induced in cucumber by *Trichoderma asperellum* T203. *Phytopathology* 95: 76-84.
124. Silvan, A.; Ucko, O.; Chet, I. 1987. Biological Control of *Fusarium* Crown Rot of Tomato by *Trichoderma harzianum* under field conditions. *Plant Disease* 71 (7): 587-592.
125. Sivasithamparam, K. and Ghisalberti, E. L. 1998. Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*. En *Trichoderma and Gliocladium* (vol.1). Kubicek, C.P. y Harman, G. E. (eds.). Taylor and Francis, Londres. pp.139-191.
126. Stefanova N. M. and Sandoval, R. I. 1995. Efectividad de bioprepados de *Trichoderma* spp., en el control de fitopatógenos de suelo. *Boletín Tecnico CIV INISAV*, 2. 10-22.
127. Stefanova, N. M. 1997. Control de enfermedades fungicas el suelo con biopreparados de *Trichoderma harzianum*. *Curso Internacional de Sanidad Vegetal*. pp1-8. MINAG.

128. Szekeres, A.; Leitgeb, B.; Kredics, L.; Antal, Z.; Hatvani, L.; Manczinger, L.; Vagvolgyi, C. 2005. Peptaibols and related peptaibiotics of *Trichoderma*. A review. *Acta Microbiol Immunol Hung* 52: 137-168.
129. Sidhu, G. S. and Webster, J. M. 1977. The use of amino acid fungal auxotrophs to study the predisposition phenomena in the root-knot: will fungus disease complex *Physiologica Plant Pathology* 11: 117-127.
130. Tjamos, E. C. y Jiménez, D. R. M. 1998. Management of disease. In: Hiemstra, J. and D. Harris (eds). *Compendium of Verticillium Wilt in Tree Species*. 55-57. Ponsen & Looijen, Wageningen, the Netherlands.
131. Tovar, C. J. 2008. Evaluación de la capacidad antagonista *in vitro* de aislamientos de *Trichoderma* spp frente al hongo fitopatógeno *Rhizoctonia solani*. Tesis para optar el grado de Microbiólogo Agrícola y Veterinario. Pontificia Universidad Javeriana Facultad de Ciencias Carrera de Microbiología y Verterinaria. Bogotá, Colombia. Pag. 81: 14.
132. Tsrer, L.; Hazanovsky, M.; Mordechi. L. S.; Sivan, S. 2001. Aggressiveness of *Verticillium dahliae* isolates from different vegetative compatibility groups to potato and tomato. *Plant Pathology* 50: 477-482.
133. Torres, H. y Gutierrez, H. 1981. *Verticillium dahliae* Kleb., Identificación y síntomas que produce en seis variedades comerciales de papas peruanas. *Fitopatología* 16: 60-68.
134. Torres, E.; Iannacone, J.; Gómez, H. 2008. Biocontrol del moho foliar del tomate *Cladosporium fulvum* empleando cuatro hongos antagonistas. *Bragantia* 67 (1): 169-178. Disponible en: <http://www.scielo.br/pdf/brag/v67n1/a21v67n1.pdf>.

- 135. Ulloa, C. J. 1996.** Enzimas micolíticas produzidas deo agente de biocontrol *Trichoderma harzianum*. En: Actas del V de Simposio del control biológico. Anais: Conferencias y Palestras. Foz de Iguaçu Parana-Brasil. 234-238.
- 136. Vinale, F.; Sivasithamparam, K.; Ghisalberti, E. L.; Marra, R.; Woo, S. L.; Lorito, M. 2008.** *Trichoderma*-plantpathogen interactions in soil agro-ecosystems. Soil Biol Biochem 40: 1-10.
- 137. Viterbo, A.; Ramot, O.; Chemin, L.; Chet, I. 2002.** Significance of lytic enzymes from *Trichoderma* spp. in the biocontrol of fungal plant pathogens. Antonie Van Leeuwenhoek 81: 549-556.
- 138. Wessel, M. y Gerritsma, W. 1994.** Re-thinking the shade policy for cocoa growing in West Africa. *In* 7th International Cocoa Research Conference 1979. Camerún, CM. p. 103-108.
- 139. Windham M.; Elad, Y.; Baker, R. R. 1986.** A mechanism for increased plant growth induced by *Trichoderma* spp. Phytopathology 76 (5):518-521.
- 140. Woo, S. L.; Scala, F.; Ruocco, M.; Lorito, M. 2006.** The molecular biology of the interactions between *Trichoderma* spp. phytopathogenic fungi, and plants. Phytopathology 96: 181-185.
- 141. Yedidia, I.; Benhamou, N.; Chet, I.; 1999.** Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. Appl Environ Microbiol 65: 1061-1070.
- 142. Yedidia, I.; Srivastva, A. K.; Kapulnik, Y.; Chet, I. 2001.** Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. Plant and Soil 235: 235-242.

- 143. Yedidia, I.; Shores M.; Kerem, Z.; Benhamou, N.; Kapulnik, Y.; Chet, I. 2003.** Concomitant induction of systemic resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* in cucumber by *Trichoderma asperellum* (T-203) and the accumulation of phytoalexins. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 7343-53
- 144. Zeilinger, S.; Reithner, B.; Scala, V.; Peissl, I.; Lorito, M.; Mach, R. L. 2005.** Signal transduction by Tga3, a novel G protein α subunit of *Trichoderma atroviride*. *Appl Environ Microbiol* 71: 1591-1597.

RESUMEN

La muerte repentina o muerte súbita causada por *Verticillium dahliae* L. es una de las enfermedades importantes en cacao, y es difícil de controlar, debido a que el patógeno sobrevive prolongadamente en el suelo, y los tratamientos químicos resultan ineficaces. El control biológico, es una alternativa de solución al uso excesivo de pesticidas y reducir la contaminación ambiental. Siendo, el hongo *Trichoderma* sp., un eficiente controlador biológico, debido a su capacidad de colonizar sustratos rápidamente, inducir resistencia sistémica adquirida en plantas, promover el crecimiento vegetal y poseer actividad antagónica contra un amplio rango de hongos patógenos. El presente trabajo se realizó con el objetivo de determinar el efecto de aislamientos de *Trichoderma* endófito en el control de *Verticillium dahliae* L., patógeno de *Theobroma cacao*. Se utilizaron 24 aislamientos de TE pertenecientes a siete especies con referencia de ser biocontroladores, que fueron proporcionados por el Laboratorio de Fitopatología del ICT. Se realizaron pruebas de antibiosis y micoparasitismo, para determinar la capacidad antagónica *in vitro* de *Trichoderma* spp endófito (TE) sobre *V. dahliae*; para lo cual se produjo metabolitos secundarios antifungicos de *Trichoderma* spp., en caldo MIN para evaluar el porcentaje de inhibición micelial del patógeno, y se empleo el método de placa pre-colonizada para evaluar el porcentaje de colonización de *Trichoderma* spp., hacia el patógeno. Los metabolitos obtenidos de los aislamientos de TE-83, TE-84 y TE-91 fueron los que completamente inhibieron el crecimiento micelial de *V.dahliae*, seguido de TE-7 y TE-20 con 61.21% y 60.49% respectivamente. Sin embargo, TE-74 y TE-39 no tuvieron efecto en el control del patógeno. En la prueba de micoparasitismo, los aislamientos que completamente colonizaron cultivos de *V.*

dahliae fueron TE-7, TE-84, T91, TE-20, TE-83, TE-102, TE-54, TE-56, TE-116, TE-108, y TE-87, seguido de TE- 6 con 63,33% de colonización a comparación de los demás aislamientos de TE que colonizaron menos del 60%. En la prueba de biocontrol en invernadero, el aislamiento TE-54 fue el que mayor redujo la enfermedad con valores promedios de 20 % de incidencia y 11,65 % de severidad; seguido de TE-3 y TE-7 con valores de de incidencia de 50 y 40 % respectivamente, y valores de severidad con 23,41 y 22,51% respectivamente; a comparación del tratamiento Control I que obtuvo valores de incidencia y severidad de 100 y 60,17 % respectivamente. Mientras que, los aislamientos que generaron mayor crecimiento radicular fueron TE-84 y TE-91 con 1083.5 y 1046.02 centímetros respectivamente, a comparación de los demás aislamientos. En cuanto a la biomasa seca, los aislamientos TE-3 y TE-91 fueron los que generaron mayor biomasa aérea (PS-A) con valores de 3,96 y 3,81gramos respectivamente, mientras que, TE-54, TE-97 y TE-3 fueron los aislamientos que generaron mayor biomasa seca radicular (PS-R) con 1,21; 1,18 y 1,17 gramos respectivamente, a comparación de los demás aislamientos y el Control I que obtuvo en PS-A y PS-R valores promedios de 3,67 y 1,01 gramos respectivamente.

SUMMARY

Verticillium wilt caused by *Verticillium dahliae* L., is an important disease of cocoa and it is difficult to control, and it is difficult to control, because the pathogen survives hold on the soil, and chemical treatments are ineffective. Biological control is an alternative solution to the overuse of pesticides and reduces environmental contamination. Still, the fungus *Trichoderma* sp., an efficient biological control because of its ability to colonize substrates rapidly, induce systemic acquired resistance in plants, plant growth promoting and possess antagonistic activity against a broad range of pathogenic fungi. This work was carried out to determine the effect of endophyte *Trichoderma* isolates in the control of *Verticillium dahliae* L., pathogen of *Theobroma cacao*. We used 24 isolates of seven species belonging to TE with reference to being biocontrols, which were provided by the Pathology Laboratory of ICT. were tested of antibiosis and mycoparasitism, to determine the in vitro antagonistic ability of endophyte *Trichoderma* spp (ET) on *V. dahliae*, for which there was antifungal secondary metabolites of *Trichoderma* spp., MIN broth to assess the percentage of mycelial inhibition of the pathogen, and use the method of pre-colonized petri dishes to assess the percentage of colonization of *Trichoderma* spp., to the pathogen. The metabolites obtained from isolates of ET-83, ET-84 and ET-91 were those that completely inhibited of *V.dahliae* mycelial growth, followed by ET-7 and ET-20 with 61,21% and 60,49% respectively. However, ET-74 and ET-39 had no effect in controlling the pathogen. Mycoparasitism in testing, the isolates completely colonized cultures of *V. dahliae* were ET-7, ET-84, ET-91, ET-20, ET-83, ET-102, ET-54, ET-56, ET-

116, ET-108 and ET-87, followed by ET-6 colonization with 63,33%, compared with other isolates that colonized ET less than 60%. In the test in greenhouse biocontrol, the ET-54 was isolated which reduced the disease higher with values of 20% incidence and severity 11,65 %; followed ET and ET-3 and ET-7 with valued incidence 50 and 40% respectively, and severity values with 22,51 and 23,41 % respectively compared to Control I treatment that received incidence and severity values of 100 and 60.17 % respectively. While the isolates producing more root growth were TE-84 and ET-91 with 1083,5 and 1046,02 cm respectively, compared with other isolates. in terms of dry biomass, isolates ET-3 and ET-91 were those that generated greater air dry weight (DW-A) with values of 3,96 and 3,81 grams respectively, while, ET-54, ET -97 and ET-3 isolates were producing more root dry biomass (DW-R) with 1,21; 1,18 and 1,17 grams respectively, compared with other isolates and the control I that was in DW-A and DW-R average values of 3,67 and 1,01 grams respectively.

ANEXOS

Anexo 1

Progreso de la incidencia y AUDPC de la muerte súbita causada por *Verticillium dahliae* en plantas de cacao de tres meses de edad colonizadas con aislamientos de *Trichoderma* endófito.

	DÍAS DESPUES DE LA INOCULACIÓN (DDI) DEL PATÓGENO ^a												
Aislamiento ^b	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	AUDPC ^c
TE-3		10	10	10	10	20	20	40	40	40	40	50	260
TE-7					30	30	30	40	40	40	40	40	270
TE-54						20	20	20	20	20	20	20	130
TE-84			10	10	10	40	40	50	60	80	80	80	420
TE-87						40	40	60	60	80	80	80	400
TE-91						20	20	60	60	80	80	90	365
TE-97	10	10	10	10	40	50	50	50	50	90	90	90	490
TE-108					10	30	30	60	60	70	70	80	370
CONTROL ^d				30	40	70	70	100	100	100	100	100	660

^a Incidencia de la enfermedad expresados en porcentaje, teniendo 10 repeticiones por tratamiento y evaluadas durante 18 días después de la inoculación del patógeno.

^c Aislamientos de *Trichoderma* endófito, inoculadas en semillas de cacao.

^d Área bajo la curva del progreso de la enfermedad (AUDPC) del porcentaje de incidencia de la enfermedad a los 18 DDI. Calculado mediante la siguiente fórmula:

AUDPC = $\sum_{i=1}^{n-1} \frac{(Y_i + Y_{i+1}) \times (t_{i+1} - t_i)}{2}$, en donde X_i = porcentaje de incidencia observados;
 t_i = tiempo (días entre cada evaluación)

^d Tratamiento testigo donde no se inoculó *Trichoderma* endófito, pero si al patógeno.

Anexo 2

Progreso de la severidad y AUDPC de la muerte súbita causada por *Verticillium dahliae* en plantas de cacao de tres meses de edad, colonizadas con aislamientos de *Trichoderma* endófito.

Severidad de la enfermedad										
Aislamientos ^c	Grado de severidad (DDI) ^a					Porcentaje de severidad (DDI) ^b				
	12	14	16	18	AUDPC ^d	12	14	16	18	AUDPC ^e
TE-3	0,23	0,43	0,76	1,28	3.82	2,99	6,93	12,85	23,92	66.47
TE-7	0,52	0,88	1,02	1,19	5.45	8,09	16,43	18,2	22,79	100.14
TE-54	0,13	0,51	0,6	0,7	2.75	1,71	9,37	10,41	13,06	54.33
TE-84	0,38	0,77	1,36	2,04	6.53	6,28	12,7	21,32	37,04	111.86
TE-87	0,31	0,97	1,51	2,28	7.55	4,11	15,3	24,92	44,31	128.86
TE-91	0,2	0,74	1,14	1,72	5.50	2,58	10,95	17,46	29,76	89.16
TE-97	0,54	1,05	1,73	2,13	8.47	8,97	16,58	30,48	38,05	141.14
TE-108	0,19	0,62	1,00	1,66	5.60	2,41	9,09	16,02	27,91	80.54
CONTROL ^f	0,92	1,91	2,34	3,06	12.76	15,67	33,83	41,79	59,82	226.73

^a Severidad de la enfermedad expresados en grados, evaluados bajo una escala de 0-4, en 4 fechas (12, 14, 16 y 18 días después de la inoculación del patógeno) en plantas de cacao de tres meses de edad, colonizadas con aislamientos de *Trichoderma* endófito.

^b Severidad de la enfermedad expresados en porcentaje, valores transformados del grado de severidad, de 4 fechas (12, 14, 16 y 18 días después de la inoculación del patógeno) en plantas de cacao de tres meses de edad, colonizadas con aislamientos de *Trichoderma* endófito.

^c Aislamientos de *Trichoderma* endófito, inoculadas en semillas de cacao.

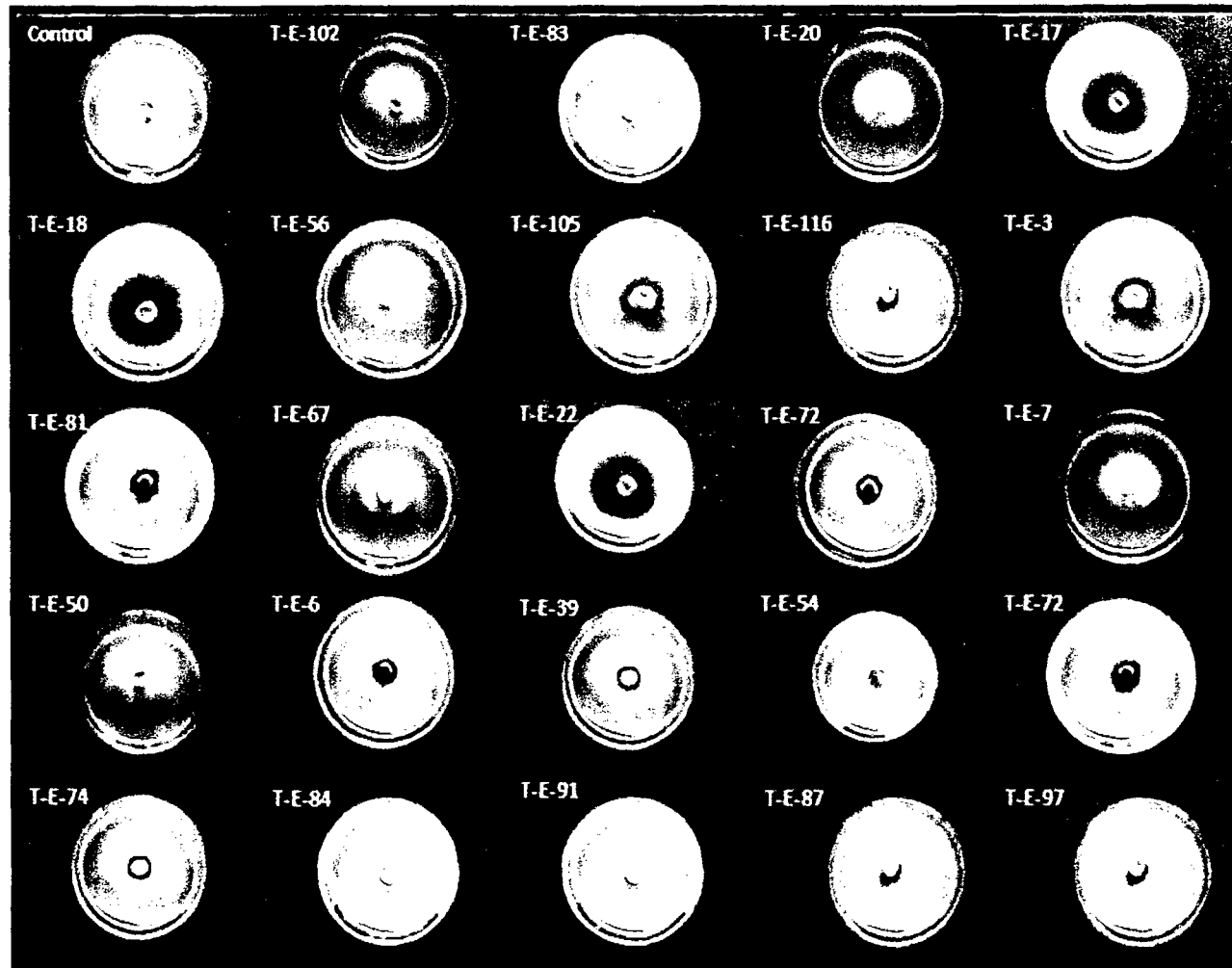
^d Área bajo la curva del progreso de la enfermedad (AUDPC) del grado de severidad a los 18 DDI.

^e Área bajo la curva del progreso de la enfermedad (AUDPC) del porcentaje de severidad a los 18 DDI.

^f Tratamiento testigo donde no se inoculó *Trichoderma* endófito, pero si al patógeno.

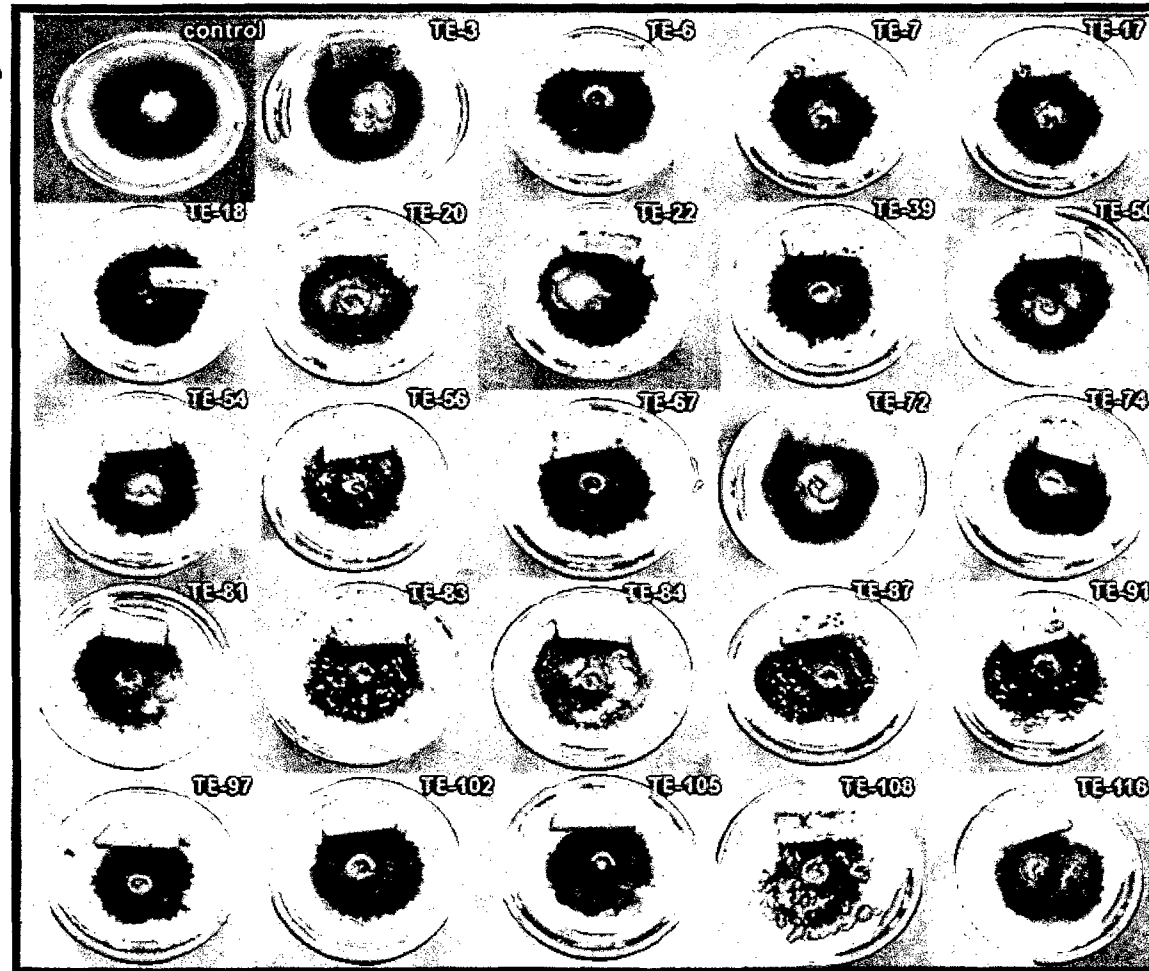
Anexo 3

Prueba de antibiosis. Efecto de los metabolitos secundarios de *Trichoderma* endófito, en la inhibición del crecimiento micelial de *Verticillium dahliae* en medio PSA. Cada placa representa un tratamiento.



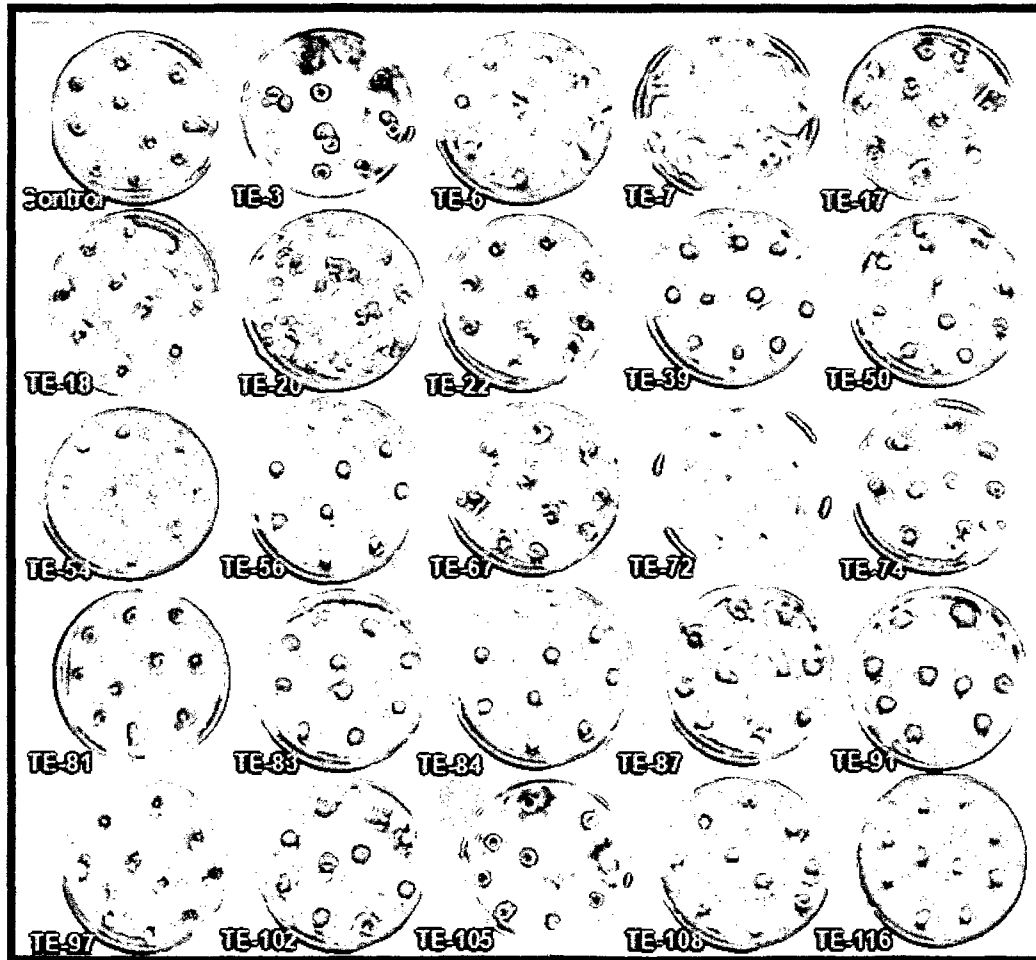
Anexo 4

Prueba de micoparasitismo. Efecto de aislamientos de *Trichoderma* endófito sobre cultivos de *Verticillium dahliae* después de 15 días de la siembra.



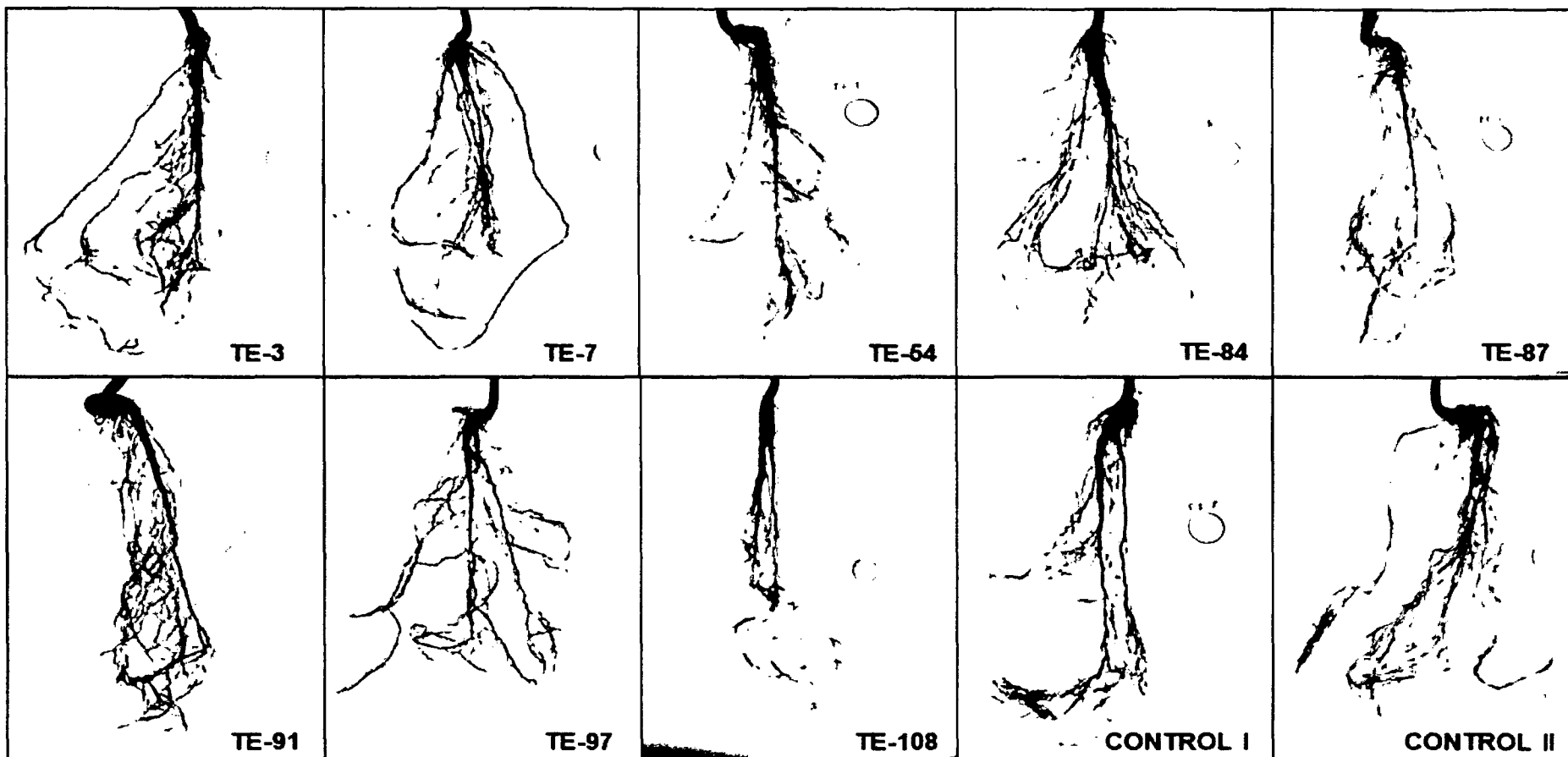
Anexo 5

Prueba de micoparasitismo. Crecimiento de *Trichoderma* y *V. dahliae* en medio PSA, 7 días después del reaislamiento de las placas precolonizadas.



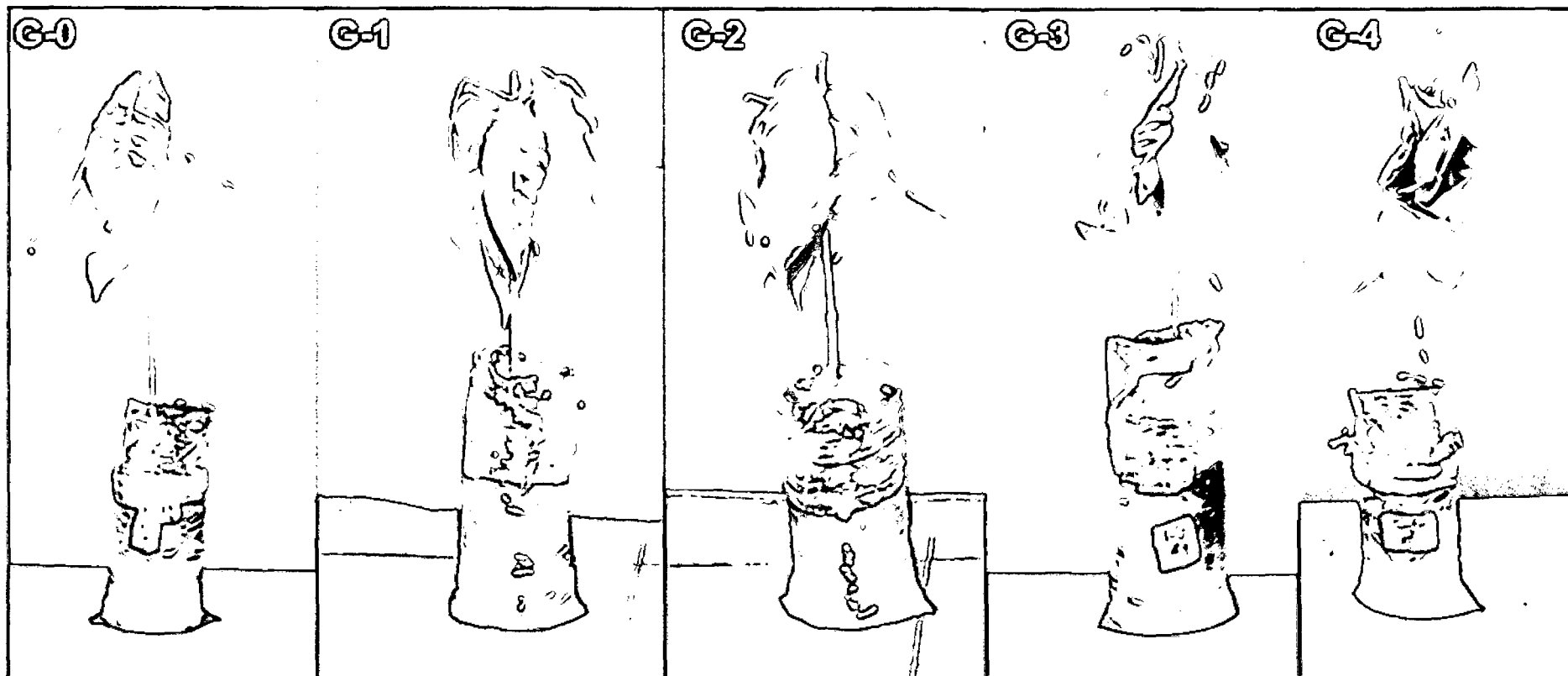
Anexo 6

Efecto de los aislamientos de *Trichoderma* endofito en el crecimiento radicular en plantas de tres meses de edad, 18 días después de la inoculación de *Verticillium dahliae*. TE (aislamientos de *Trichoderma* endofito), CONTROL I (sin *Trichoderma* y con *Verticillium dahliae*) CONTROL II (Sin *Trichoderma* y sin *Verticillium dahliae*).



Anexo 7

Progreso de los síntomas de la severidad de la Muerte Subita causada por *Verticillium dahliae* en plantas de cacao de tres meses, durante 18 días después de la inoculación del patógeno.



G-0). Grado cero, no se observan síntomas tipo de marchitamiento. **G-1).** Inclination del pedicelo de las hojas superiores y jóvenes. **G-2).** El marchitamiento esta acompañado por síntomas de clorosis y amarillamiento foliar. **G-3).** Mas del 50 % de la hoja muestra síntomas de clorosis y arrugamientos **G-4).** Las hojas cloróticas se secan y cae debido al avance de la enfermedad y muerte de la planta.

Anexo 8

Análisis de suelo utilizado para la producción de plátanos de cacao *Theobroma cacao*.

SOLICITANTE : Lab. Fitopatología ICT (Atte. Ing. Betsabe León T.)										FECHA DE MUESTREO : 14/04/2011									
PROCEDENCIA : San Antonio de Cumbaza-Tarapoto-San Martín-San Martín										FECHA DE RECEP. LAB : 20/04/2011									
EXPERIMENTO : Arboles Forestales										FECHA DE REPORTE : 29/04/2011									

Número de la muestra				pH	C.E dS/m	CaCO ₃ (%)	M.O (%)	N (%)	P (ppm)	K (ppm)	ANÁLISIS MECÁNICO			CIC	CATIONES CAMBIABLES					Suma de bases	% Sat. de bases				
											Arena	Limo	Arcilla		CLASE TEXTURAL	Ca ²⁺	Mg ²⁺	K ⁺	Na ⁺			Al ³⁺ +H ⁺			
Lab.		Campo												%					mg/100						
11	04	00162	M1	4.64	0.06	0.00	2.17	0.10	20.13	30	71.68	8.00	20.32	Est-Arc-Are	3.05	0.71	0.12	0.03		2.14	0.91	29.95			

MÉTODOS:

TEXTURA : HIDROMETRO

pH : POTENCIOMETRO Suspensión Suelo-Agua relación 1:2.5

CONDUCC. ELECTRICA : CONDUCTIVIMETRO Suspensión Suelo-Agua relación 1:2.5

CARBONATOS : GAB - Volumétrico

FOSFORO : OLSEN MODIFICADO EXTRACT. NaHCO₃ +0.5%, pH 8.5 5pp. Vis

POTASIO : OLSEN MODIFICADO EXTRACT. NaHCO₃ +0.5%, pH 8.5 5pp. Absorción Atómica

MATERIA ORGANICA : WALKLEY y BLACK

CALCIO Y MAGNESIO : EXTRACT. KOI 0.1N 5pp. Absorción Atómica

ACIDOS INTERC. : EXTRACT. KOI 1N. Volumétrica

Ing. MSc. Luis Zúñiga Cernades

Especialista Suelos ICT

La Banda de Shicayo, 29 de Abril del 2011

